أساسيات الكيمياء الحيوية للأغذية

Fundamentals of Food Biochemistry

الجــزء الأول

البروتينات والإنزيمات

Proteins & Enzymes

دكـــتور

محمد يحيى على الهوارى

أستاذ ورئيس قسم علوم تكنولوجيا الأغذية

كلية الزراعة بطنطا

جامعة طنطا

١٩٩٧ - ١٩٩٨

المحتويات contents

الباب الأول

الباب الثاني

الباب الثالث

الباب الرابع

الباب الخامس

الباب الأول

البروتينات بصفة عامة

Proteins in general

تعريفها ووجودها Defination & Occurance

- البروتينات هى مركبات عضوية معقدة التركيب توجد فى جميع أجزاء المادة الحية من نباتات وحيوانات وكائنات حية دقيقة واهميتها فى الحياة عرفت منذ قديم الأزل . إسمها مشتق من الكلمة اللاتينية أو الصفة اللاتينية TIWTELOS وتعنى الأعظم أهمية من الدرجة الأولى Most important from the first rank ولقد إقترح تسميتها بواسطة الكيميائى الهولندى ميلدر Mulder ١٨٣٨ م . وفى جسم الحيوان فإن البروتينات تمثل العنصر التركيبى الرئيسى فى العضلات - الجلد - الشعر - الأنسجة الضامة كما توجد بتركيز عالى فى بذور النباتات . كذلك فإن الإنزيمات وبعض الهرمونات هى بروتينات وعلى هذا فالبروتينات مهمة جداً للحياة فى كل التكوينات العضوية .

العناصر المكونة للبروتين Composition of proteins

البروتينات تحتوى على الكربون والهيدروجين والأكسجين والنيتروجين وفى العادة يوجد الكبريت والفوسفور ووجود النيتروجين

يعتبر احد المكونات الهامة حيث يعطى الخواص الفريدة الخاصة للبروتينات .

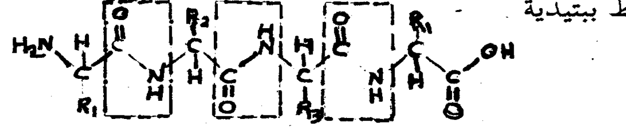
الرابطة البيتيدية The peptide bond

على الرغم من تعقيد البروتينات وإتساع إنتشارها فى كل الكائنات الحية فإن جميع البروتينات وجد أنها تتكون من ٢٠ وحدة بنائية 20 structural units يطلق عليها الاحماض الامينية Amino acids والأحماض الامينية عموماً لها الرمز العام

$$R-\underset{H}{\overset{NH_3}{C}}-COO^- \rightleftharpoons R-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-COOH$$

Z witter ione الايون الثنائى

وتوجد مجموعة الأمين فى الوضع ∝ الفا بالنسبة لمجموعة الكربوكسيل أى على ذرة الكربون الفا وترتبط الاحماض الامينية فى جزئى البروتين بروابط ببتيدية



ويتم نزع جزئى ماء H_2O مكونة أميد للحامض الثانى كما فى الشكل الثانى للبروتين Conjugated proteins . هذا ويوجد جزئيات غير بروتينيية

مرتبطة بالبروتين مثل السكريات (الجلوكوز والجلاكتوز والجلوكوز أمين والجلاكتوز أمين والسياليك والدهون وحامض الفوسفوريك والأحماض النووية وغيرها .

Sulfur-containing amino acids:

Cysteine $-HS \cdot CH_2 \cdot CH \cdot (NH_2) \cdot COOH$

Cystine $-S \cdot CH_2 \cdot CH \cdot (NH_2) \cdot COOH$

$\quad\quad\quad\; | $

$\quad\quad\quad S \cdot CH_2 \cdot CH \cdot (NH_2) \cdot COOH$

Methionine $-CH_3 \cdot S \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$

الأحماض الامينية : Amino acids

وهى الوحدة البنائية الأولى للسلسلة الببتيدية التى يتكون منها البروتين وتقسم هذه الأحماض إلى ٣ مجموعات على حسب المجموعة الجانبية R فهى إما تحتوى على سلسلة جانبية متأينة أو غير متاينة قطبية أو غير قطبية اليفاتية أو عطرية .

the peptide bond

تركيب الألفا (α) أحماض أمينية الموجودة عادة فى البروتينات

A. Amino Acids with Ionic Side Chains

Name and 3- and 1-letter abbreviations*	Structure	pK_1 α-COOH	pK_2	pK_3	pI†
Aspartic acid (Asp, D)	$HOOC-CH_2-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-COOH$	1.88	3.65 β-COOH	9.60 α-NH_3^+	2.77
Glutamic acid (Glu, E)	$HOOC-CH_2-CH_2-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-COOH$	2.19	4.25 γ-COOH	9.67 α-NH_3^+	3.22
Lysine (Lys, K)	$H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-COOH$	2.18	8.95 α-NH_3^+	10.53 ε-NH_3^+	9.74
Arginine (Arg, R)	$H_2N-\overset{NH}{\overset{\Vert}{C}}-\overset{H}{N}-CH_2-CH_2-CH_2-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-COOH$	2.17	9.04 α-NH_3^+	12.48 guanidinium	10.76
Histidine (His, H)	$(C_3H_3N_2)-CH_2-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-COOH$ (imidazole ring: N, NH)	1.82	6.00 imidazolium	9.17 α-NH_3^+	7.59
Tyrosine (Tyr, Y)	$HO-C_6H_4-CH_2-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-COOH$	2.20	9.11 α-NH_3^+	10.07 phenolic —OH	5.66
Cysteine (Cys, C)	$HS-CH_2-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-COOH$	1.96	8.18 thiol	10.28 α-NH_3^+	5.07

B. Amino Acids with Non-ionic Polar Side Chains

Name and 3- and 1-letter abbreviations*	Structure	pK_1 α-COOH	pK_2 α-NH_3^+	pI†
Asparagine (Asn, N)	$H_2N-\overset{O}{\overset{\Vert}{C}}-CH_2-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-COOH$	2.02	8.80	[illegible]
Glutamine (Gln, Q)	$H_2N-\overset{O}{\overset{\Vert}{C}}-CH_2-CH_2-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-COOH$	2.17	9.13	5.65
Serine (Ser, S)	$HO-CH_2-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-COOH$	2.21	9.15	5.68

Name and 3- and 1-letter abbreviations*	Structure	pK_1 α-COOH	pK_2 α-NH_3	pI
B. Amino Acids with Non-ionic Polar Side Chains				
Threonine (Thr, T)	$CH_3-CH(OH)-C(NH_2)(H)-COOH$	2.09	9.10	5.60
C. Amino Acids with Nonpolar Aliphatic or Aromatic Side Chains				
Glycine (Gly, G)	$H-C(NH_2)(H)-COOH$	2.34	9.60	5.97
Alanine (Ala, A)	$H_3C-C(NH_2)(H)-COOH$	2.34	9.69	6.00
Valine (Val, V)	$(CH_3)_2HC-C(NH_2)(H)-COOH$	2.32	9.62	5.96
Leucine (Leu, L)	$(CH_3)_2HC-CH_2-C(NH_2)(H)-COOH$	2.36	9.60	5.98
Isoleucine (Ile, I)	$CH_3-CH_2(CH_3)HC-C(NH_2)(H)-COOH$	2.36	9.60	6.02
Methionine (Met, M)	$CH_3-S-CH_2-CH_2-C(NH_2)(H)-COOH$	2.28	9.21	5.74
Proline (Pro, P)	$CH_2-CH_2-C(H)(COOH)-N(H)-CH_2$ (ring)	1.99	10.60	6.30
Phenylalanine (Phe, F)	$C_6H_5-CH_2-C(NH_2)(H)-COOH$	1.83	9.13	5.48
Tryptophan (Trp, W)	indolyl$-CH_2-C(NH_2)(H)-COOH$ (N-H)	2.83	9.39	5.89

الببتيدات والتسمية :-

وتدل تسمية الببتيدات على موضع الأحماض الأمينية فى السلسلة chain بدءًا من الطرف الذى يحتوى على المجموعة الأمينية الحرة free amino group والتى تظهر فى الجهة اليسرى من المركب ويضاف المقطع يل (yl) إلى نهاية اسم كل حمض أمينى فيما عدا الحمض الأمينى النهائى الذى يحمل مجموعة الكربوكسيل الحرة) unsubstituted ويتضح هذا عند تسمية رباعى الببتيد التالى بأنه :" ألانيل - جليسيل - تيروزيل - حمض الجلوتاميك

$$CH_3-CH(NH_2)-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH-CH(CH_2-C_6H_4-OH)-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH-CH(CH_2-CH_2-COOH)-COOH$$

Alanylglycyltyrosylglutamic acid

وتسمى الأحماض الأمينية كما بينا من قبل بإضافة المقطع (يل) إلى اسم الحمض الأمينى ، وهكذا يكتب جليسيل ، الأنيل ، سيرين ... الخ ممثلة الأحماض الأمينية : جليسين ، والأنين ، وسيرين . ويجب الانتباه إلى التفرقة فى التسمية بين جلوتاميل وجلوتامينيل وكذلك أسباراتيل وأسباراجينيل . وعموما ، فعند كتابة ترتيب الأحماض الأمينة فى ببتيد أطول ، فيستحسن كتابة الاختصارات ذات الحروف الثلاثة أو الحرف

الوحدة التى تدل على كل حمض أمينى ، بدلا من كتابة الاســم كـاملا .
ويمكن الدلالة على تركيب رباعى البتيــد الســابق -H2N-Ala-AGYE Gly-Tyr
Glu COOH وتسـتخدم هـذه الحروف المختصـرة لبيـان الـتركيب فقــط ،
ولاتستخدم للدلالة على الأحماض الامينية الحرة .

هذا ويعتبر الجلوتامين والاسـبارجين الاميـدات للاحمـاض الامينيـة الحـامض سـبارتيك والجلوتـاميك علـى التـوالى وكذلـك المشـتقات الهيدروكسيلية للاحماض الامينية ليسين والبرولين وتظهر بعض البروتينـات والمشتقات الهيدروكسيلية شائعة فـى الأنسـجة الضامـة Connective Tissues وكل الأحماض الامينية ماعدا الجليسين تكون نشطة ضوئياً وتكون الـذرة التى يرتبط بها كل من مجموعة الكربوكسيل عبارة عـن ذرة كربـون غـير متناسقة

NH2
1*
R—C- COOH
1
H

Asymetric Carbon Atom
ذرة كربون غير متناسقة

هـذا وجميـع الأحمـاض الأمينيـة المكونـة للبروتينـات إمـا إن تكـون أحماض أمينية من النوع ل L - amino acids أو تكـون مـن النـوع D حـامض أمينى ويمكن تخليقه فى حالات استثنائية فقط فى الأنظمة الحيوية .

4-hydroxyproline

5-hydroxylysine: $NH_2CH_2CH(OH)(CH_2)_2CH(NH_2)COOH$

الأنواع الايونية للاحماض الامينية: Ionic species of amino acids

نظراً لتواجد كل من مجموعة الأمين (NH2 -) تعمل كمستقبل للبروتون proton acceptor ومجموعة الكربوكسيل (COOH -) تعمل كمعطى للبروتون proton donor فى المحاليل المائية للاحماض الامينية فإنها سوف تتواجد فى ثلاث صور :-

$$\underset{(a)}{R-\underset{NH_3^+}{CH}-COOH} \underset{1}{\rightleftharpoons} \underset{(b)}{R-\underset{NH_3^+}{CH}-COO^-} + H^+ \underset{2}{\rightleftharpoons} \underset{(c)}{R-\underset{NH_2}{CH}-COO^-} + 2H^+$$

١ – فى البيئة الحامضية Acidic medium

فى الظروف الحامضية أى عند وجود تركيزات أعلى من أيونات الايدروجين فإن الحامض الامينى يكون فى صورة كاتيون Cation ويرمز له بـ الرمز (A).

٢ – فى البيئة القاعدية Basic medium

توجد الاحماض الامينية فى الصورة الانيونية anionic form أى الصورة (B).

٣ – البيئة المتعادلة The electrostatically neutral form

أى أن الشحنة الكهربية على جزئى البروتين تساوى صفر ويكون فى صورة أيون ثنائى القطبين zwitter-ion وهذا الجزيء لا تحدث له هجرة كهربية عند تعرضة للمجال الكهربى عند PH معين وهو نقطة التعادل الكهربى وعند وجود الحامض الامينى على الأيون الثنائى القطبية Zwitter ion فيمكن حساب الـ PH التى تعرف بنقطة التعادل الكهربى Isoelectric point (I.E.P) والتى يمكن حسابها من ثوابت الانحلال لكل من مجموعة الكربوكسيل ومجموعة الامين K_1 , K_2 على التوالى تسمى PH_I أى نقطة التعادل الكهربى فإن $PH_I = \frac{1}{2} (PK_1 + PK_2)$

حيث PK_1 PK_2 وهى الأس السالب للوغاريتم ثوابت الانحلال K_1 K_2 على التوالى وللحامض الأمينى الجليسين Glycine

فإن $PK_1 = 2.34$ $PK_2 = 9.6$

فإن $PH_1 = \frac{1}{2}(2.34 + 9.6)$

وتتراوح قيمة PH_I للاحماض الامينية المتعادلة أى المحتوية على مجموعة أمين واحدة ومجموعة كربوكسيل واحدة بين (٥, ٥ – ٦) بينما تكون قيمة الـ PH_I للاحماض الامينية الحامضية أى التى تحتوى على عدد مجموعات كربوكسيل أكبر من مجموعات الأمين تكون قيمتها ٧٧, ٢ مثل الحامض الامينى اسبارتيك و للحامض الأمينى الجلوتاميك ٢٢, ٣ .

وعلى العكس من ذلك فى حالة الاحماض الامينية القاعدية مثل الهستدين ٥٩, ٧ و الليسين ٤٧, ٩ ، الارجنين ٧٦, ١٠.

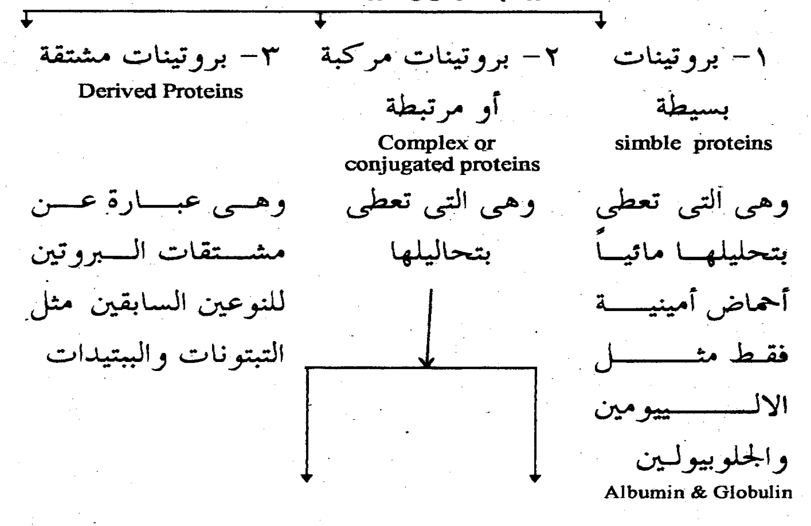
تقسيم البروتينات Classification of protein

البروتينات متعددة الانواع ومعقدة التركيب وواسعة الانتشار ولذلك فإن التقسيم الواضح للبروتينات يعترية صعوبات عديدة . وفى بداية القرن الحالى اقترح تقسيم البروتين على أساس تركيبى ولكن كان تقسيماً غير كافياً Scanty ، واساس التقسيم الحالى هو الذائبية Solubility

والتجلط coagulation ومساهمة مواد غير بروتينية فى تركيب البروتينات أو ما يعرف بالمجاميع المرتبطة وهى مجاميع غير الاحماض الامينية .

وهذا التقسيم القديم لا يضع فى الاعتبار الخواص الكيماوية الحيوية Biochemical propertios

تقسيم البروتينات Classification of proteins



أحماض أمينية
Amino acids

حزء لا بروتينى مرتبط بالسلاسل الببتيدية

Prosthetice group = non protein moiety

ومثال لها الكازين والكاباكازين .

Casein and K- casein

أولاً: وتقسم البروتينات البسيطة إلى :

١ – البروتينات الصلبة Sclero proteins

وهى غير ذائبة أساساً وهى بروتينات ليفية Fibrous proteins وهى على درجة عالية من التبلور وهى مقاومة للتحلل بمعظم الانزيمات وتناسب الوظائف التركيبية فى عالم الحيوان ومن أمثلتها :

أ– الكولاجين Collagens

يعتبر المادة الرابطة الإساسية فى العظام bones والغضاريف Cartilage والانسجة الضامة connective tissue والقشرة الخارجية للجلد epidermis .

ب– الكيراتين Keratins

ويعتبر البروتين الأساس فى تركيب الشعر والأظافر وخيوط الحرير ويحتوى على فيبروين Fibroin وسيرسين Sercin .

٢ – البروتينات الكروية Spheroproteins

هى تلك البروتينات التى تتكون من سلاسل ببتيدية ذو شكل كروى وتشمل الأقسام الآتية :–

أ– الالبيومنيات Albumins

وعموماً تذوب فى الماء ومحاليل الأملاح المخففة وترسب بواسطة كبريتات الامونيوم قرب التشبع ومثال لها البيومين بياض البيض Albymine

والبيومين شرش اللبن Lacta albumin والبيومين سيرم الدم Blood serum albumin . وتتجلط بالحرارة .

ب- الجلوبيولينات Globulins

وعموماً غير ذائبة ولكن منها الذائب فى محاليل الاملاح المخففة . ومن أمثلتها ميوسين Myosin العضلات ، اللاكتوجلوبيولين اللبن Lactoglobulin ، الجليسينين Glycinin فى فول الصويا والأراكسين Arachin فى الفول السودانى ، جلوبيولين البلازما فى الدم وتتجمع بالحرارة.

ج- الجلوتيلينات Glutelins

لا تذوب فى الماء ولا فى محاليل الأملاح المخففة ولكن تذوب فى القلويات والحماض ولكن لا تذوب فى المحاليل المتعادلة وتتخثر بالحرارة ومن أمثلتها : جلوتين لقمح Glutin الارز Oryzenin وتنتشر فى النباتات .

د- البرولامينات Prolamines

تذوب فى الكحولات ٥٠- ٨٠٪ لا تذوب فى الكحلول المطلق ولاتذوب فى الماء او المحاليل المتعادلة ومن أمثلتها : جلايدين Geliadin القمح وزيين Zein الذرة وبتحليلها تعطى نسبة كبيرة من الحامض الأمينى برولين Proline .

و- الهستونات Histones

وهى بروتينات ذات وزن جزئى منخفض وتحتوى على نسبة كبيرة من الأحماض الأمينية القاعدية وهى تذوب فى الماء والأحماض المخففة ولا تذوب فى محاليل الامونيا المخففة تتخثر بالحرارة ومن امثلتهــا الهستونات فى السمك Fish sprcatazaa ، الجلوبين globin فى الدم .

ى- البيومينويدات Albiominoids

وهى أساساً بروتينات مثل البروتينات البسيطة ولكنها لا تذوب فى المحاليل المتعادلة والأحماض والقلويات المخففة ومن أمثلتها البروتينــات فــى الأنسجة الدعامية مثل : الكيراتين Keratin والكولاجين Collagen والجيلاتين عبارة عن البيومينويدات .

ثانيا : البروتينات المرتبطة أو المعقدة Complex or conjugated proteins

تعريفها : هى تلك البروتينات التى يتحد معها جزئــى غــير بروتينــى وتسمى thetic group،

١ - الفوسفوبروتينات Phosphoproteins:

ويحتــوى علــى حــامض الفوســفوريك متصـــل بالسلســلة الببتيديــة بواسطة رابطة الاستر مع مجاميع الهيدروكسيل (OH) فى الأحماض الامينيــة سيرين serine أوثريونـــين Threonine مثــال ذلــك كازينــات اللــبن - Calcium

phosphocaseinate ، فيتالين صفار البيض vitellins هـذا وقد وجد أن هـذه البروتينات بروتينات معقدة التركيب وغير متجانسة تتكون من بروتينـات أخرى أصغر فعلـى سبيل المثال أن كـازين اللبن مركـب غير متجانس يتكون مع α،β،γ،K الفا ، بيتا ، جاما ، كابـا - كازينـات والتـى تختلـف عن بعضها اختلافاً محسوسـاً فـى الهجـرة الكهربائيـة Relatine electrophoretic mobitity فى الاوزان الجزيئية ، التهابات الأمينية والكربوكسيلة والـتركيب الكلى من الأحمـاض الأمينيـة ونقـط التعـادل الكهربـائى كذلـك الذوبـان والترسيب .

٢ - الجليـكوبروتيـنات والـبروتينـات السكرية

Glycoproteins and Saccharoproteins

Glycoproteins and Proteinpoly saccharides يحتـوى كـل منهمـا علـى كربوهيدرات يختلفان فى طول السلسلة الكربوهيدراتيـة المتصلـة بـالجزء البروتينى protein moiety وفـى حالـة الأولى يكـون طـول السلسـلة قصـير short chain وفـى الحالـة الأخـيرة يكـون طـول السلسـلة طويـل وهـذان البروتينان مهمان جداً خاصـة ، البروتينـات التركيبـة فـى جسـم الحيـوان وتنتشر هذه النوعية فى الأنسجة الضامة ووجودها فى الافرازات المخاطية وأعطيت تسمية لهم بأنها البروتينات المخاطية Muco Proteins وهذه الأخـيرة

عند تحليلها تعطى سكريات أمينية amino sugars ، حامض يوريك uronic acid ومن امثلتها الميوسين Mucin .

٣- ليبوبروتينات Lipoproteins :

عبارة عن بروتينات مرتبطة بالدهون ولكن طبيعة الرابطة بين الدهن والبروتين فى هذه المواد دائماً غير معروفة حيث أن الجزء الدهنى دائماً يمكن ازالته بالاستخلاص بالمذيبات العضوية الروابط التساهمية Covalent bonds بين البروتين والدهن يمكن أن تكون هى المسئولة والليبوبروتينات فى الدم لها وظائف فسيولوجية هامة .

٤- كروموبروتينات Chromoproteins :

وحيث تكون المجموعة المرتبطة prosthetic group عبارة عن ميتالبوفرين metaloporphyrin مثل الكلوروفيل فى النباتات الخضراء)مثل الهيمين Hemin فى الهيموجلوبين Hemoglubin كذلك انزيم البروكسيدير Peroxidase ، الكتاليز Catalse والسيتوكروم والميوجلوبين myoglobins للعضلات .

٥- البروتينات النووية Nuc Leoproteins :

والتى تكون المجموعة المرتبطة prosthetic group عبارة عن الأحماض النووية من نوع RNA أو DNA ويكون الارتباط بواسطة روابط ملحية مع البروتين .

الباث الثانى

التفاعلات اللونية للبروتينات

Colour reactions of proteins

توجد عدة جواهر كشافة تعطى تفاعلات لونية مميزة مع البروتينات وهذه التفاعلات ترجع إلى وجود مجاميع معينة فى جزئى البروتين ، هـذه التفاعلات مهمة جداً للتقدير الوصفى Qualitative وكذلك للتقدير الكمـى لهذه البروتينات Quantitative ونكتفى منها بالتفاعلات الآتية :

أولا: تفاعل الزانثوبروتين : *The xanthoprotein reaction*

عندما يتم تسخين البروتين مع حامض النتيريك المركز يكون راسب ابيض يتحول فى الحال إلى اللون الأصفر وعند اضافة قلوى أو محلول أمونيا مركز يتحول إلى اللون البرتقالى وبسبب هذه التفاعلات تواجد الأحماض الامينية العطرية مثل (فينايل الأنين والتيروزين وتريتوفان) .

ثانيا: تفاعل البيوريت : *The biuret reaction*

يتكون لون يتراوح بين اللون القرمزى إلى اللون البنفسيجى عند يعامل محلول بروتين فى قلوى قوى مع محلول مخفف من كبريتات النحاس ، التفاعل يميز البروتينات المحتوية على رابطة الببتيد CO-N-H والمرتبطة مع بعضها مباشرة أو منفصلة بواسطة ذرات كربون أو نيتروجين ولذلك ، التفاعل يحدث بواسطة رابطة الببتيد أو يمكن يحدث التفاعل بواسطة مواد غير بروتينية بها التركيبات الآتية :

NH
C=O
R-CH
NH
C=O
رابطة ببتيدية

NH2
C=O
NH
C=O
NH2

البيوريت biuret

ثالثا: تفاعل النينهيدرين: Reaction with Ninhydrin

حيث يعطى البروتين أو الببتيدات أو الأحماض الأمينية الحرة لون أزرق مع النينهيدرين Ninhydrine (Triketohydrenedin)

بروتين + ننهيدرين ← مركب يعطى لون أزرق

ويستعمل هذا التفاعل فى التقديرات اللونية سواء كان ذلك للتقدير الوصفى أو الكمى .

رابعا: تفاعل فولن Folin's reaction :

عند تسخين البروتين أو الأحماض الامينية مع جوهر كشاف Folin's reagent لون أحمر

البروتين + بيتا نافثوكينون سلفونات ← لون أحمر

red Colour ← B. naphthe quinone sultonate + proten

ويمكن قياس هذا اللون المتكون بواسطة جهاز قياس الالوان الاسبكتروفوتوميتر Spectrophotometer

الشحنات الجزيئية التي على جزئي البروتين تحدد القوى داخل السلسلة الببتيدية وبين السلاسل وبعضها وبين السلاسل والوسط المحيط .

وعلى ذلك فإن كثيراً من الصفات الخارجية للبروتين تتأثر بـ الـ PH واللزوجة والذائبية والاحلال والدوران الضوئي ويفترض أن لها الحد الأدنى من القيم عند نقطة التعادل الكهربى وإنفصال البروتين بطريقة التبادل الايوني يعتمد على الـ PH وبإنخفاضها عن I.E.P فإن الشحنة تدمص على كانيون مبادل أيوني مثل الكربوكس مثيل سليلوز . بينما العكس يتم على مبادل أنيوني DEAE سليلوز (Diethylamino-Ethyl-Cllelose) وهذه الخاصية تسمح بفصل وتفريد البروتينات بما يعرف بالتبادل الايوني .

كذلك فإن حركة جزئيات البروتين في المجال الكهربائي تعتمد على الـ PH وبواسطة هذه الخاصية إستطاع تيزيليوس Tiseluse أن يبدأ فصل وتنقية البروتينات بواسطة ما يعرف بالتحليل الكهربائي ومن هذه الطرق :

١ – *طريقة التحليل الكروماتوجرافي* ***Chromatography*** وتعني كلمة كروماتوجرافي أي عملية فصل والأساس في هذه الطريقة هو عمل ترشيح **على حسب الوزن الجزيئي للبروتينات**

الخواص العامة للبروتين General properties of proteins

لقد سبق أن ذكرنا بعض المميزات العامة للبروتين وذلك للتعرف على تركيب البروتينات فى محاليلها وليسهل التعرف على الخواص العامة للبروتين ومن هذه الخواص مايلى :-

أ- الوزن الجزئى molecular weight

الوزن الجزئى لبروتين كبير جداً ويتراوح بين ٥٠٠٠: ٥٠٠٠٠٠ دالتون وهذا المدى الواسع راجع إلى إختلاف حجم البروتينات إختلافاً كبيراً وعلى الأخص عدد ونوع الأحماض الامينية الداخلة فى التركيب .

ويوضح الجدول التالى الوزن الجزئى لبعض البروتينات

Protein	MW
Cytochrome c	13,000
Ribonuclease	14,000
Myoglobin, horse	17,000
Growth hormone (somatotropin), human	21,500
Carboxypeptidase	34,000
Pepsin	35,500
Ovalbumin, hen	40,000
Hemoglobin, horse	65,000
Serum albumin, human	66,500
Serum γ-globulins	160,000
Catalase	250,000
Fibrinogen	330,000
Urease	480,000
Thyroglobulin	660,000
Hemocyanin, octopus	2,800,000

الأوزان الجزيئية ونقطة التعادل لبعض البروتينات..

ويمكن التعرف على الوزن الجزئى للبروتين بعدة طرق منها :

١ – سرعة الترسيب – الانتشار Sedimentation velosity- diffusion

وتتأثر السرعة التى تترسب عندها الجزئيات عن طريق القوة الطاردة المركزية centrifugal force بالآتى :–

١– القوة المستخدمة force applied

٢– الحجم – الشكل – كثافة الجسم
The size, shape and density of the particle

٣– كثافة ولزوجة المذيب density and viscosity of the solvent

وقد وجد أن الجزئيات الكبيرة تترسب أولاً بقوة الطرد المركزى العالية أما الجزئيات الصغيرة فتحتاج إلى أجهزة طرد مركزى فائقة السرعة Ultracentrifuges تصل بها عدد اللفات إلى ٧٥,٠٠٠ لفة / دقيقة وقوة تعادل ٤٠٠,٠٠٠ مرة قدر قوة الجاذبية الأرضية . فيحدث تركيز للبروتين وتكون طبقة فاصلة بين البروتين والمحلول الرائق (المذيب) وعن طريق قياس هذه الطبقة المترسبة فى أوقات مختلفة يمكن معرفة ثابت الترسيب Sedimentation constant وهذا الثابت يعطى دلالة عن الوزن الجزئى للبروتين . وتقدر سرعة الترسيب عن طريق إمرار الأشعة فوق البفسيجية Ultraviolet (٢٣٠–٢٩٠ نانومتر) خلال الخلية ويقاس الامتصاص الضوئى للبروتين من أعلى وأسفل الخلية .

وعن طريق أجهزة شليرين البصرية يمكن رؤية الطبقة واضحة المعالم المتكونة بين البروتين ويقاس كذلك التغير في معامل الانكسار Referactive index وهذا التغير يساوى التغير فى التركيز . وإذا إحتوى المحلول على أكثر من نوع من البروتين تظهر عدة طبقات محددة المعالم تختلف فى حجم الجزئيات ويعرف البروتين بانه غير متجانس Heterogenous عكس البروتينات النقية تتميز بتجانس طبقاتها الواضحة المعالم Heterogenous .

ويوضح الشكل التالى (A) تركيز البروتين (B) معامل ترسيب البروتين من أعلى لأسفل (dc/dx) فى أوقات مختلفة وتساوى x المسافة عن مركز الطرد المركزى و T = الزمن

(a) (b)

وبواسطة أجهزة شليرين البصرية يمكن مراقبة إنتشار الطبقة واضحة المعالم وتعيين معامل الانتشار diffusion constant ويوضح الشكل التالى ظاهرة الانتشار . وعند ظهور عدد من القمم يدل على أن البروتين غير متجانس (مخلوط) Heterogenous.

٢ – الاتزان الترسيبى Sedimentation Equilibrium

ويحدث الاتزان الترسيبى عندما يحدث أتزان تام لتوزيع البروتين فى أطوال الخلية المستخدمة – حيث تتساوى حركة البروتين لأسفل نتيجة الطرد المركزى مع حركته لأعلى نتيجة الانتشار ويعتمد ذلك على الوزن الجزئى للبروتين .

٣– الترسيب فى محاليل السكروز المتدرجة :

Sedimentation in Sucrose Gradients

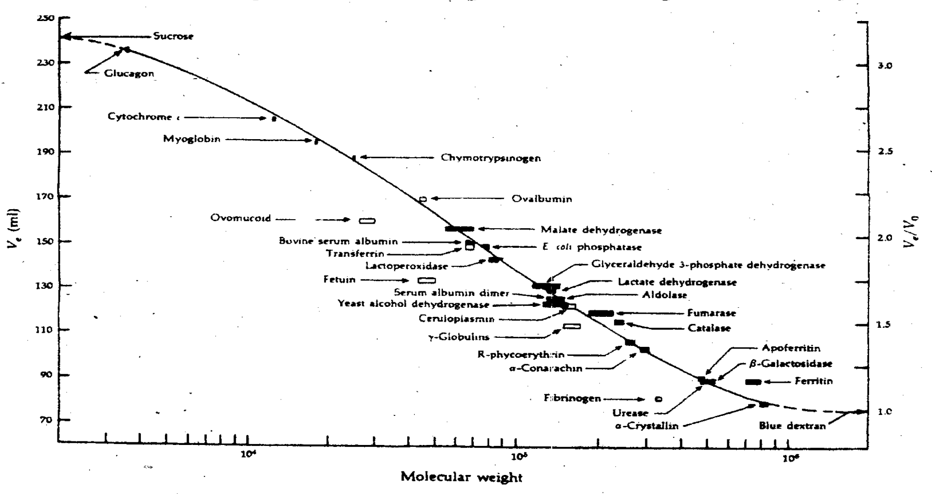
وفى هذه الحالة يتم الترسيب بواسطة الطرد المركزى العالى وتوضع العينة المراد معرفة الوزن الجزئى لها فوق سطح محلول سكروز متدرج الكثافة ويراعى وجود بروتين قياس (معروف سرعة ترسيبة) وتنفصل المواد على هيئة طبقات فى صورة متدرجة ويعرف نوع البروتين بمقارنة سرعة ترسيبته بالبروتين القياس .

٤– إستخدام المرشحات الجزيئية :

Filtration on molecular sieves

وتعرف هذه الطريقة بالترشيح بالجيل gel filtration أو الترشيح على البولى اكريل أميد polyacrylamide أو السيفاوكس جيل Sephadex gel حيث تستخدم أعمدة زجاجية يوضع بها الجيلات تشبه أعمدة التحليل الكروماتوجرافى وذلك يمكن الفصل بين المركبات ذات الأوزان الجزيئية

المختلفـة علـى حسـب سـرعة سـريانها علـى حسـب حجـم الجزئيـات والأوزان الجزيئية مع إستخدام مواد معروفـة الأوزان الجزيئيـة للمقارنـة . مع العلم بأنه لابد أن تختزل الروابط ثنائية الكـبريتيد قبـل تحليـل الـبروتين بواسطة إضافة المركابتوايثانول ويوضح الشكل التـالى العلاقـة بـين حجـم السائل والوزن الجزئى للبروتينات على السيفادكس جيل Sephadex Gel .



شكل ٤ – ٤ : العلاقة بين حجم سائل الطرد للوزن الجزيئى للبروتينات على الدكستران (سفادكس

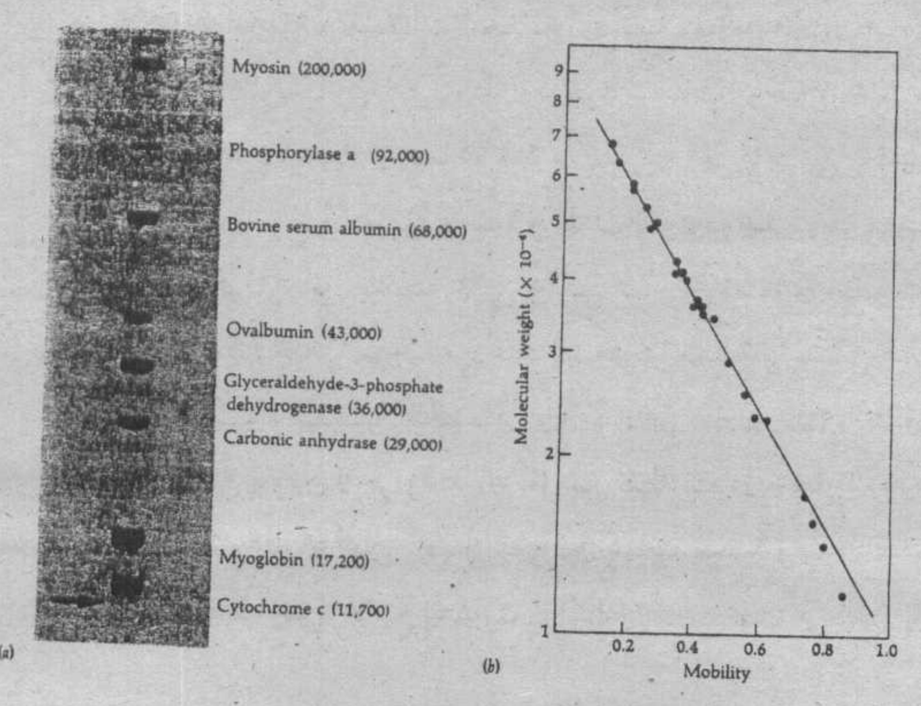
٥– طريقة الترشيح بالجيل أو الحمل الكهربى أو الالكتروفوريسس

Gel Electrophoresis or Gel Filtration

وجد أن البروتين يصبح منفرداً أى يفقد إنثناءاته وذلك عند تعرضـه لمحلول كبريتـات دوديسـيل الصوديـوم Sodiumdodecyal Sulfate (S.D.S) لبضـع دقائق على ١٠٠°م ويحدث اتحاد بـين SDS وإثنـين حـامض أمينـى وتظهـر

هذه المركبات على شكل قضبان يتناسب طولها مع الوزن الجزئى ومثلما ذكر سابقاً لابد من إختزال الروابط ثنائية الكبريتيد الموجودة فى البروتين .

ويوضح الشكل التالى طريقة الالكتروفوريسس فى فصل مخلوط البروتينات فى وجود محلول الفوسفات المنظم ثم صبغها بالكوماسية الأزرق Commasi لإظهار البروتينات .



فصل مخلوط من البروتينات بواسطة الحمل الكهربائى على SDS gel

٦ – شكل جزئيات البروتين Shape of protein Molecules

يتخذ جزئى البروتين أشكالاً عديدة مثل الشكل الكروى أو الشبة كروى أو شكل غير متناسق وتعطى هذه البروتينات صورة المجسم الناقص ويظهر شكل البروتين من الضوء المنعكس وعليه يمكن حساب الوزن الجزئى للبروتين .

ب– الخاصية الامفوتيرية للبروتينات Amphoteric Properties of Proteins

تسلك البروتينات سلوكاً ترددياً (أو أمفوتيرياً) فى التفاعل مع كل من الأحماض المخففة والقلويات المخففة أى أنها تتفاعل مع الأحماض كقلوى ومع القلويات كحامض وذلك لوجود شحنات موجبة (مجموعة الأمين) وشحنات سالبة (بمجموعة الكربوكسيل) على الجزئى وكمية هذه تعتمد على نوع الأحماض الامينية وكذلك الـ PH وعند درجة معينة من الـ PH يكون صافى الشحنة على جزئى البروتين تساوى صفر أى تتساوى عدد الشحنات الموجبة مع عدد الشحنات السالبة وتسمى هذه النقطة بنقطة التعامل الكهربى Iso- electric Point (I.E.P.) وتختلف هذه النقطة من بروتين لأخر وعند PH أقل من نقطة التعادل يحمل البروتين شحنة موجبة وعند pH أعلى يحمل البروتين شحنة سالبة وهذه الصفة الامفوتيرية تعتمد على المجاميع إبسيلون .ε المتأينة E.amino group فى اللبن إلى

مجموعة الجوانيدين فى الأرجنين إلى الجاماكربوكسيل فـى الجلوتاميك أو مجموعة SH فى الـ Cysteine السستئين .

$$^{+}NH_3—CHR—COOH \rightleftharpoons H^{+} + {}^{+}NH_3—CHR—COO^{-}$$

جـ – ذوبان البروتينات Solubility of proteins

تقسم البروتينات على أساس الذوبـان فـى المـاء وهـى علـى حالتهـا الطبيعية بأن بعضها يذوب فـى المـاء والبعـض الآخـر لا يـذوب فـى المـاء ودرجة الـ PH تؤثر تأثير مباشر على هذه الخاصية حيـث أن تغـير الــ PH أعلى أو أقل مـن نقطـة التعـادل الكهربـى تزيـد الذائبيـة أى بزيـادة عـدد الشحنات الموجبة أو السالبة يؤدى ذلك لزيادة ذوبان الـبروتين . وإضافـة بعض الاملاح تحدث زيادة أو تقلل من ذوبان البروتين على حسـب نـوع الشحنة التى يحملها الملح فعندما يحمل شحنة مطابقة لما هو موجـود علـى البروتين يحدث أنجذاب للماء داخل البروتين ويحـدث مـا يعـرف بـالتمليح الداخلى Salting in أو الإذابة الداخلية وتعتمـد علـى تركـيز الايونـات أمـا الأملاح المتعادلة تتفاعل مع المجموعات الايونية للبروتين فيقلل من التفـاعل بين جزئيات البروتين مع بعضها وتزداد قوى التلاصق بين الماء وجزئيـات البروتين ودخول الماء داخل الجزئى .

أما عند زيادة تركيز الاملاح المتعادلة تتشبع الجزئيات داخلياً بالماء فيزداد التفاعل البينى بين جزئيات البروتين وتلتصق البروتينات مع بعضها وتترسب وتسمى هذه الظاهرة بالتمليح الخارجى أوالترسيب بالتمليح Salting out وعند وجود أملاح تحمل شحنة مخالفة لشحنة البروتين تصل هذه الظاهرة إلى أقصاها عند نقطة التعادل الكهربى (I.E.P.)

ويمكن ترسيب البروتينات أو تقليل الذوبان بواسطة المذيبات العضوية مثل الميثانول والإيثانول والاسيتون فهذه المذيبات شرهة لإمتصاص الماء من جزئى البروتين .

د- التحليل الطيفى للبروتينات Spectral analysis of proteins

يمكن التعرف على تركيب البروتين عن طريق التحليل الطيفى ويتم ذلك بعدة طرق .

١- باستخدام المجالات الكهرومغناطيسية السريعة التذبذب Rapidly oscillating electromagnetic feilds

٢- بواسطة إنكسار الأشعة السينية X- ray diffraction crystals

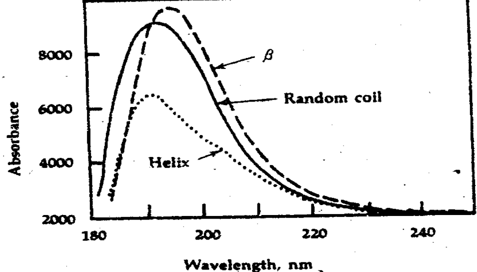
٣- طرق طيفية (الاسبكتروسكوبيك) Spectroscopic methods

هـ - الامتصاص الطيفى للبروتين Absorption spectra of proteins

تمتص بعض البروتينات الضوء عند طول موجة بين ١٨٠-٣٠٠ نانومتر وذلك لوجود مجموعات تسمى كروموفورات Chromophores لها

القدرة على إمتصاص الضوء . والبروتينات التى تحتوى على الاحماض الامينية العطرية تمتص الضوء عند طول موجة ٣٠٠:٢٥٠ نانومتر (ن م) ويتغير الامتصاص الطيفى لمحلول البروتين بتغير الـ PH (٨-١٢) نتيجة لتأين مجموعة الفينول الموجودة بالسلسلة الجانبية للتيروزين .

وكذلك تغير طبيعة البروتين denaturation (تغير التركيب الفراغى ثلاثى الأبعاد) ويمكن حساب التركيز التقريبى للبروتين باستخدام خلية سمكها ١ سم بها محلول بروتين تركيزة ١ مجم / مل = ١, ١ + ٥, حيث يمثل A المتوسط للامتصاص بالنسبة لعدة بروتينات قدرت عشوائيا ، وتمتص الروابط الببتيدية الطيف عند ١٩٠ - ٢٠٠ ن م .ويفيد الامتصاص الطيفى للبروتين فى معرفة تركيب البروتين ، ويوضح الشكل التالى أطياف الامتصاص العديدة . للببتيد العديد للحامض الامينى ل - ليسين Poly - L- Lysine عند إذابتة فى مذيبات تسمح له بالالتفاف .



الإمتصاص الطيفى فى منطقة الأشعة فوق البنفسجية للبولى ليسين فى مذيبات مختلفة تسمح للبوليمر بالالتفاف فى عدة أشكال .

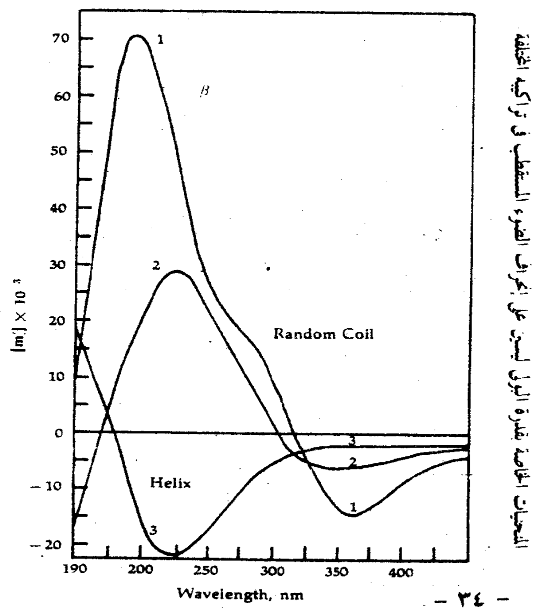
و- الدوران الضوئي للبروتينات Optical rotation of protein

للبروتينات القـــدرة علـى دوران مســـار الضـــوء المســتقطب rotate polarized light ويعتمد ذلك على

١ - الاحماض الامينية الداخلة فى التركيب .

٢- شكل السلاسل عديدة الببتيد .

والانحراف النوعى للبروتين يتراوح بين ٣٠-٦٠° ويـزداد الانحـراف النوعـى سـلبيا بحـدوث دنـترة للـبروتين denaturation وبذلـك نســتنتج أن الـدوران الضوئـى Optical rotation يتغـير بتغـير طبيعـة الـبروتين أو الشــكل التركيبى للبروتين ويوضح الشكل التالى تأثـير الشـكل الـتركيبى للـبروتين على دوران الضوء المستقطب للحامض الامينى البولى ل ليسين تبعاً لتغير الشكل التركيبى له . وتفيد هذه الخاصية فى تعيـين المحتـوى الحـــلزونى للـــبروتين helical contents .



المنحنيات الخاصة بقدرة البولى ليسين على انحراف الضوء المستقطب فى تراكيبه المختلفة

ى – التغير فى التركيب الطبيعى للبروتين Denaturation of proteins

لكل بروتين تركيب طبيعي ممكن أن يحدث له تغيرات تركيبة على حسب نوع البروتين وهذه العملية تعمل على تحطيم الروابط غير التساهمية وقد يؤدى ذلك لفقد البروتين لوظائفه البيولوجية على حسب التغيرات فى الشكل التركيبى للبروتين . وهناك عدة طرق تحدث تغير فى الشكل التركيبى ١- المعاملة بمحلول مائى من هيدوكلوريد الجوانيدين (٨-١٠ مولار) .

٢- باستخدام محلول اليويا (٨-١٠ مولار) ويساعد على التغيير بالطرق السابقة أن البروتين يزيد ذوبانه فى وجود محاليل هيدروكلوريد الجوانيدين واليوريا المركزة .

٣- المذيبات العضوية وذلك عن طريق تحطميها للروابط الهيدروفوبية .

٤- رفع درجة الحرارة لمحلول البروتين أعلى من (٥٠-٦٠° م) وقد يكون التأثير عكسى أو غير عكسى .

٥- التبريد كما هو الحادث لبعض الانزيمات حيث تفقد نشاطها بالتبريد لأقل من صفرْ م .

٦- التغير فى الـ PH الذى يؤدى إلى إختلاف الروابط الكهرواستاتيكية . ويختلف هذا التأثير من بروتين لآخر .

على المستوى الجزئى تعرف بأنهـا أى تغيير فى التركيب البنائى للبروتين ويتضمن تحطيم الروابط الثانوية مثل روابط S-S ، الروابط الهيدروجينية والروابط الهيدروفوبيك والمسئولة عن التركيب الخام للبروتين ولكن لايحدث أى كسر للروابط التعاونية ولايحدث تحليل مائى للبروتين وتكون النتيجة هى فرد البروتين Unfolding للبروتين الحبيبى إلى مجمع عشوائى Randomly coiled ويكون التغير غير عكس irreversible كما يظهر فى الشكل التالى :

إعادة التركيب الطبيعى

تغير التركيب الطبيعى

بروتين مدنتر مفرود

بروتين خام ملفوف

هذا ودنترة البروتين مهمة لقوام وتركيب العديد من الأغذية على الأخص ظهور مجاميع الـ SH فى اللبن المعامل بالـ U.H.T والبسترة البطيئة والسريعة كذلك الأغذية المحتوية على SH مثل البيض .

الباب الثالث

الببتيدات : peptides

إن الببتيدات هى عبارة عن ناتج إتحاد جزئين أو اكثر من الأحماض الأمينية من خلال مجموعة ألفا أمين لأحد الأحماض الأمينية مع مجموعه الفاكربوكسيل لجزئ حامض أمينى أخر مثال : عملية تكثيف أو إتحاد Condensation بين الحامض الأمينى جليسين والحامض الأمينى ألانين.

```
         H                  H   CH3
H2 N - CH - CO|OH + H|- N - CH - COOH
   Glycine          |      Alanine
   gly - Ala (3)    ↓
    G - A   (1)
       H               CH3
H2N - C - Co - NH - CH - COOH
       H
GLy - Ala + H2O ──────► GLycine + Alanine
                Catalyst
```

(ببتيد ثنائى) gycyl-alanine جليسيل الامين

– ويسمى الببتيدات السابق ببتيد ثنائى بينما الببتيدات المتكونة من ثلاث أو اربعة أحماض أمينية تسمى ببتيدات ثلاثية أو رباعية على التوالى .

– ويحتوى كل جزئ ببتيد على مجموعة (α أمين) حره على اليسار ومجموعة كربوكسيل حره على اليمين. هذا وترتبط الأحماض الأمينية فى الببتيدات برابطه يطلق عليها الرابطة البيتتديه (-C-NH-) ويعبر عنها بالتالى إما بالرموز الثلاثية 3 letter code أما 1 letter code يصطلح على ان التركيب البنائى للبتيد بان يحتوى على رابطة ببتيديه ومجموعة α أمين حره على اليسار ومجموعة كربوكسيل حره على اليمين. وكلمة ببتيد تطلق على ناتج يحتوى على من (٢:٢٠) حامض أمينى أما كلمة polypeptide فتطلق على ناتج أو مركب يحتوى على (٢٠:٥٠) حامض أمينى أما الذى أزيد من ٥٠

حامض أميني فيطلق عليها البروتينات .

ولقد فصل العديد من الببتيدات والبولي ببتيدات والتي لها أهمية فسيولوجية مثل vasprcessin-oxytocin الأنسولين LHIRH-Insulin- ACTH .

تقدير محتوى الببتيدات من الأحماض الأمينية

Determination of the A.A composition

– لتقدير محتوى الببتيدات والبولي ببتيدات من الأحماض الأمينية فيجب أولاً ان تتحلل لمكوناتها من الأحماض الأمينية.

$$\text{Gly-Ala} + \text{H20} \xrightarrow{H^+} \text{Glycine} + \text{Alanine}$$

– وهذا التفاعل يمكن ان ينشط (catalyzed) بواسطة كاتيون الهيدروجين H^+ أو أنيون الهيدروكسيل oH^-

– وتوجد طريقه منتشرة إنتشاراً واسعه لتحليل الببتيدات أو البروتينات إلى مكوناتها الأساسيه من الأحماض الأمينية وهى عمل خليط من البروتينات والببتيدات مع حامض HCL ٦ عيارى على درجة حراره ١١٠م٥ لمدة ٢٤ ساعه فى أنابيب صغيره ملحومه ومفرغه من الهواء وتحت ضغط من الـN.

– ولهذه الطريقه بعض العيوب إذ أنه يتم تحطيم بعض الأحماض الأمينية تحت هذه الظروف ولايمكن تقديرها وعلى ذلك يجب تقدير هذه الأحماض الأمينيه بطريقه أخرى مثل التحليل القلوى ثم يجرى التقدير الكمى أو الوصفى للأحماض الأمينية بواسطة التبادل الايونى Ion exchange.

تقدير ترتيب الأحماض الأمينية فى جزئ الببتيد :

Determination of the amino acid sequence

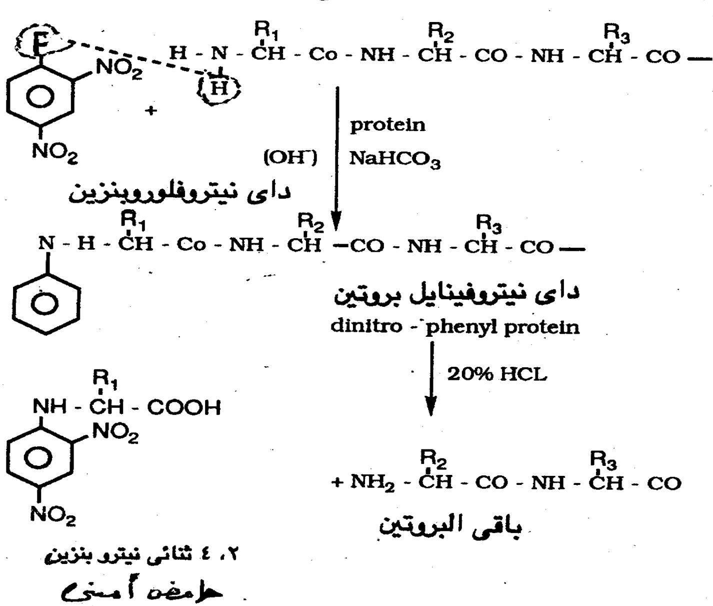
لمعرفة التركيب البنائى للببتيدات (peptide) أو الببتيدات العديدة (poly p.) فإن الخطوات هى :

١- تقدير التركيب الكيميائى لمخلوط الأحماض الأمينيه وصفياً وكمياً.
٢- تقدير ترتيب أو تتابع الأحماض الأمينيه فى جزئ الببتيد أو الببتيد العديد الـPoly peplide

مثال : يتكون الـ (LHRH) من : -Arg.-His-Glu-Gly-Ser Trp-Tyr- prolen.

ولكن هذا التركيب لايعطى أى دلاله عن الآلاف من الترتيبات المحتمله لهذا التركيب لإعطاء هرمون له التأثير الحيوى المعروف لهرمون الـ(LHRH) - هذا ويتم تقدير الـ (amino acid sequence) بواسطة مجموعه من طرق التحاليل تساعد بعضها البعض وتحقق بعضها البعض ويوجد تكنيك رئيسى متكامل يوضح فيما يلى :

١- تقدير النهايات الأمينيه Determination of N-ter minal للبروتين بواسطة sanger's method (1945). يعتبر إستخدام ٢، ٤ ثنائى فلوروبنزين (2,4 dinitro flouro benzene) من أهم التجارب فى كيمياء البروتينات وتعتمد الطريقه على التفاعلات الآتيه :



- مشتقات الـ (dinitro phynel benzene) وهى عباره عن مشتقات ذات لون أصفر وحساسه للضوء وعلى ذلك يجب ان يتم التفاعل فى الظلام.

ويتم التفاعل فى الخطوات التاليه :-

١- التفاعل مع ٢ , ٤ دا ى نيترفلوروبنزين

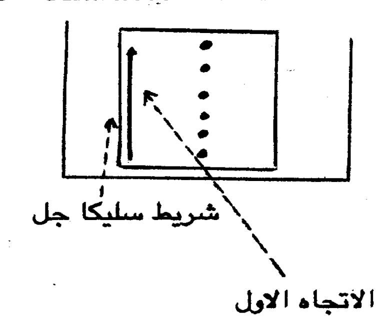
1- Dinitro phenlation.

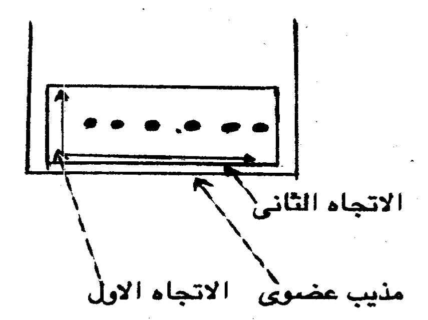
٢- إزالة الزائد من DNFB

٣- تحليل المشتقات بواسطة الحامض — 3- DNP. Dervatves

٤- إزالة مشتقات الـ — 4- DNP amino acid

٥- التمييز — 5- Characterization





التمييز بطريقه غير مباشرة :

يتم تحليل الـ(DNP. AA) بواسطة التحليل باستعمال الأمونيا ammonolysis والحامض الأمينى الناتج يميز بواسطة paper chromatogrphy وتسمى طريقه (1951) low ther ويمكن تقدير الـ (DNB . AA) بطريقة كميه عن طريق عمل calibration curves من الأحماض الأمينيه DNB بواسطة قياس photometrically ومنها يمكن

حساب عدد سلاسل الببتيدات داخل جزئ البروتين .

٢- تقدير النهايات الأمينيه (NH2) : N-terminal determination

يتم ذلك بواسطة Dansyl chloride method والتى اقترحت من العلماء Gray & Hgrthy (1963); Groy (1967) وذلك بواسطة Dimethy L-amino naph thyl--sulfony chloride فى بيئة قلوية .

وكالمثل فى الطريقه السابقه يتم تكوين المشتق DNS-protein ولا يمكن تحليل هذه الرابطة المتكونه خلال عمليات التحاليل التاليه وعلى ذلك بعد تحليل المشتق (DNS) للبروتين كان أو ببتيد يمكن التعرف على (Flourescent DNS aminoacid) .

ومن مميزات هذه الطريقه عن الطريقه السابقه مايلى :-

١- لاتحتاج إلى عملية استخلاص المشتق بعد عملية التحليل الحامضى بل يتم التمييز مباشرة بواسطة الكروماتوجرافى أو chromatography أو الالكتروفوسيس أو electrophoresis thin layer chromatogrphy

٢- تتميز هذه الطريقه بالحساسيه الكبيره إذن أن الفلوروسينس (the flouresence) ويكون اقصى اثاره لمشتقات دانسيل كلوريه Dansyl chlorid حول (٥٥٠) (نانومول) nm و نتيجة للاتساع الشديد فانه يمكن تمييز هذه المشتقات بتركيز (١-٥) nm بواسطة التحليل الكهربائى electrophoresis أو (٢ , - ١) بواسطة التحليل الكروماتوجرافى ذو الطبقات الرقيقه thin-layer chromatognphy هذا وتتداخل مشتقات الدسنل كلوريد احماض امينيه Dansyl amino acids لهذه الاحماض مع بعضها . للتروزين ومجموعه الزمين إبسيلون للسستين (EDNSystin) من سلاسل ببتيدات داخليه (Inter chains) أو مع مجاميع الكبريت وتكون

سلفونايل كلوريد مشتقات الدانسيل.

ويمكن تقدير النهايات الأمينيه N-terminal determination

يتم ذلك بواسطة phenyliso-thio-cynate ويمكن ان يوضح التفاعل كما فى الرسم القادم. حيث أن الـ (PTC) يتحول إلى فينيل ثيوكرباميل والذى يعاد ترتيبه فى بيئه حامضيه وبعد ذلك يتم عمليه فصله كنتيجة لتكوين الحلقه ويتكون. مايعرف بـ phenyl thio hydontion A.A (PTH)

معادلات التفاعل :-

step 1 (dilute alkali)

Phenylisothiocyanate + Polypeptide (n residues)

step 2 (dilute acid)

Phenylthiocarbamoyl (PTC) peptide

Phenylthiohydantoin + Polypeptide (n-1 residues)

- أدخلت عملية التكسير بواسطة EDMAN ١٩٥٠ ، ١٩٥٣ وعند تفاعل (PTC) مع البروتين يتكن phenyl thio crbonyl مشتق (PTK) ويتم إعادة ترتيب هذا الجزئ فى بيئه حامضيه acidic media وبعد ذلك يتم فصله كنتيجة لتكوين الحلقه والجزئ المفصول هو عباره عن PTH-phenyt tio hydantion A.A بينما الجزء الباقى هو عباره عن البروتين الأصلى مفصولاً عنه الحامض الأمينى لنهاياته الأمينيه ويتكون له نهاية NH2 أمينيه جديده وعلى هذا تتفاعل هذه مع مركب PTL وعليه يمكن النهايه الأمينيه الجديده وهكذا يمكن تقدير الببتيد أو البروتين من الأحماض الأمينيه .

خطوات التقدير:

١- إضافة الـ PTC الفيتابلايزوسيوانات.

٢- Cyclization of PTK تكوين الحلقه.

٣- extraction إستخلاص الـPTH استخلاص المشتق .

٤- تمييز وتقدير الـPTH اوتحليل الببتيدات القصيره.

٥- تكرار عمليه التكسير والتمييز.

ونظراً لإختلاف ذوبان الببتيدات والبروتينات فإنه يمكن إختيار ظروف ذوبان كلى.

٦- يتم تمييز الـ(pTH) مشتقات الـ A.A مباشره بواسطة الكروماتوجرافى chromatography غير مباشر بواسطة التكسير 6NHCL Ba (oH)2 وتتميز الأحماضالأمينيه المنطلقه وهذه الطريقه الأخيره لاتصلح للتقديرات الكميه لأنها مصحوبة بإنحلال شديد للمركبات المتكونه.

معرفة التركيب البنائى وبالتالى تحضير ببتيدات لها أهميه من النواحى الطبيه والصناعية كما هو الحال فى هرمون (gastrin) فعند معرفة أن خمسة أحماض أمينيه من النهايه الأمينيه لها قدره حيويه عاليه biological وعليه فيمكن تحضيرها من ببتيد مخلق Active synthetic peptide.

– وبالمثل فى حـــاله الـ (L.H.R.H) hypothaly وهـو يفـــرز فى الخنازير بكمية ضئيله جداً ويلزم آلاف الخنازير لتحضير كمية ضئيله جداً منه وعليه يمكن استعمال ببتيد مخلق بدلاً من تحضيره من الخنازير الذى يكون تحضيره منها عملية مكلفه جداً.

طرق الفصل :

– مثل ماسبق فى الأحماض الأمينيه فإن الببتيدات يمكن فصلها بطرق التـحليل الكرومـاتوجـرافى (chromatograpy) والتـــحليل الكهـــربى (electrophoresis).

– ومن الطرق المفيده طريقة بصمات الأصبع (Finger prints) وذلك بإجـــراء (electrophoresis) على شـريط من ورق الترشـيح (medium electrophoreis) – ثم إجراء الجريان الثانى عمـودياً على الجريان الأول (at right angles) ويكون باسـتـخدام فـولت عـالى (٢٥٠٠–٥٠٠٠) فـولت (High voltage electrophoresis)

ويمكن كذلك تقدير تتابع الأحماض الأمينيه : Determination of amino acid sequence.

بواسطة الطرق المختلطه Mis cellaneous method

The Dansyl - EDMAN method:

فى هذه الطريقه بعد إزالة الأحماض الأمينيه (A.A) من الببتيد المحلل بواسطة EDMan والببتيد المتبقى يمكن ان يقدر بواسطة Danylsd النهاية الأمـينيـة تفـصل ويمكن تقدير الـ Nerminal وكنتيجة للحساسية الشديده

بطريقه الـDNS يمكن تقدير (١٠:٢٥) حامض أمينى بدقه تامه من أو umcle ميكرومول من الببتيد .

- ويتضح أهميه معرفة ترتيب الأحماض الأمينيه من نواحى عديده منها :
- ويستخدم هذا التفاعل لتقدير البروتينات والاحماض الأمينيه كمياً بواسطة (spectrophotometer).
- وتعتبر المشكلة الأساسية فى التحليل هو إيجاد تحليل كامل للبروتين إلى أحماض أمينيه بدون تحلل بعضها.

وبطريقة أخرى يمكن تقدير النهايات الأمينيه بواسطة leucine amino-peptidase عند فعل إنزيم ليوسين أمينو ببتيديز فإن الحامض الأمينى الذى يحتوى على مجموعة (NH2) فينفصل من الببتيد أو البروتين ويستمر التحليل من الحامض الأمينى ذو النهاية الأمينيه التالى عند النهاية الأمينيه الجديده .

٣- تقدير النهاية الكربوكسيليه :

Determination of the C-terminal hydrosinolysis

أ- بواسطة anhydrous hydrazine

ب- بواسطة إنزيم carboxy peptidase A & B

ويختلف carboxy peptidase (A) عن (B) فى أنه ليس له القدره على فصل الأحماض الأمينيه القاعديه بينما (B) قادر على فصل جميع الأحماض الأمينيه :

التحليل المائى للبروتينات hydrolysis :

- يمكن تحليل الرابطة الببتدية فى البروتينات بواسطة الأحماض أو القلويات أو بعض الإنزيمات ومع التسخين كما سبق ذكره فى موضوع الببتيدات فإن تحت الظروف الحامضيه لعدة ساعات عند درجة ١١٠م وفى وجود HCL بتركيز ٦ مولر فإن بعض الأحماض الأمينيه تتأثر ويتم تحللها.

مثال :

cystene, cysteine and methionine وذلك لحدوث اكسده جزئيه لهم وعلى الأخص فى وجود أى كميه من الاكسجين فيتحول الأول والثانى إلى (cysteic acid) .

$$2\,NH_2-\underset{\underset{COOH}{|}}{\overset{\overset{CH_2-SH}{|}}{CH}} \xrightarrow{+O} H_2N-\underset{\underset{COOH}{|}}{\overset{\overset{CH_2-S}{|}}{CH}} \quad \underset{\underset{COOH}{|}}{\overset{\overset{-S-CH_2}{|}}{HN-CH}} \xrightarrow{+SO}$$

Cysteine — Cystine

$$\overset{2-}{HN}-\underset{\underset{CO^-}{|}}{\overset{\overset{CH_2-SO_3H}{|}}{CH}}$$

Systeic acid

$$H_2N-\overset{\overset{(CH_2)_2-S-CH_3}{|}}{COOH} \xrightarrow{Oxidator} H_2N-\overset{\overset{(CH_2)_2-S-O-CH_3}{|}}{CH}-COOH \longrightarrow NH_2-\overset{\overset{(CH_2)_2-SO-CH_3}{|}}{CH}-COOH$$

Methionine — Sulfoxide — Sulphone

- ويتحطم التربتوفان ويكون تحطيمه كاملاً فى وجود الكربوهيدرات .
- كما أن الأحماض الأمينيه المحتويه على مجموعة oH تتحلل ببطئ عند التحليل المائى الحامضى.
- كما ان Mulder (1939) وهومن أوائل الذين عملوا بكمياء بروتينات الألبان أجرى التحليل المائى بالقلوى ولقد وجد انه يحدث تحلل تام للأحماض الأمينيه التاليه : (Arg, Ser. Ths, Cys)

Ninhyrine (I) $\xrightarrow{SnCl_2}$ 2 - Hydroxyn inadione (II) + (1) → Hydrin dantin

والتحليل الجزئى للبروتينات يعطى ببتيدات قصيره تحتوى على أحماض أمينيه بسيطه ويوجد العديد من الببتيدات فى البروتين مثل الجلوتانيون على سبيل المثال glu-cys-glu حيث تساهم مجموعه CooH فى تكوين الرابطة الببتيديه على عكس باقى الأحماض الأمينيه.

اكسدة والإختزال oxidation, reduction

١- تزيد صلابه البروتينات. S-S ⟶ SH

٢- تفسر عملية استخدام الـ bromaes وعوامل الاكسده فى الخبز

٥- الخواص الغرويه للبروتينات : المواد الغروية هى المواد التى لها وزن جزئى يتراوح ما بين ($١٠^{٦}$ ، $١٠^{٩}$)

- وتقع البروتينات داخل حدود الجزئيات الغروية .
- وجزئيات البروتين فى المحاليل يمكن ان تتميز وتكون تجمعات ميسلات البـروتينات حـيث تمتص الماء وتنتفخ والمكان الرئيسى لامـتصـاص الماء

للموضوع الرابطه الببتديه عن طريق الروابط الهيدروجينيه.

ولزوجة محاليل البروتين تتبع معادله Einsteins equation

للزوجه لمعلق والذى فيه الطورالمنتشر the dispersed phase علـى

شكل كروى spherical $ns = nm (1+2.5\phi)$

حيث أن ns لزوجة المعلق ، nm لزوجة المذيب، ϕ الحجم

ويمكن استخدام معادلة أينشتين لحساب الإنحراف عن الكرويه spher

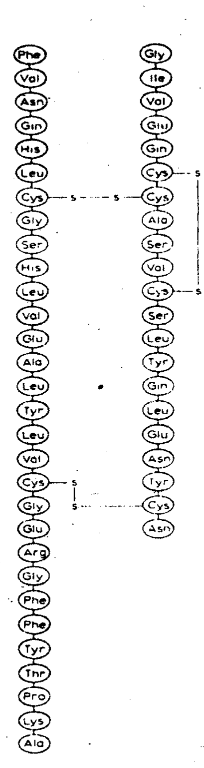
أو تقدير solvation الانحلال.

دراسة التركيب البنائى البروتينات structare of proteins

لمعرفة التركيب البنائى للبروتين يلزم معرفة كل من الوزن الجزيئى Molecular weight وكذلك الحد الادنى للوزن الجزيئى .Minimum MW والتـركـيب الكلى للاحـمـاض الأمـيـنيـه total amino acid composition وكذلك تتابع الاحماض الامينيه Linear aminoacid sequence على طول السلسلة الببتيدية وهذا مايطلق عليه بالتركيب الأولى للبـروتين primary structure لجزئ البروتين كذلك يلزم معرفة النهاية الامينيه N-terminal والنهاية الكربوكسيلية C-terminal ، والشكل التركيبى الثانوى للبروتينات secondary structure والشكل الثالث tartiary structure والرباعى Quaternary structure ، ويتضح ذلك عن فحصها بالأشعة السينية x-ray deffraction أو باستخدام الميكروسكوب الالكترونى وتفيد دراسة التركيب البنائى للبروتين فى معرفة القيمة البيولوجية لنوع البروتين .

التركيب الأولى للبروتين : primary structure

وهو عبارة عن ترتيب أو تتابع الاحماض الامينية فى جزئى البروتين. وقد تم التعرف على التركيب الأولى لجزئ الأنسولين انظر الشكل الآتى



Amino acid sequence of beef insulin.

ترتيب وتتابع الاحماض الامينية فى جزيئ الانسولين

بواسطة الاشعة السينية أو معرفة ترتيب تسلسل الأحماض الأمينيه وذلك بواسطة التحليل المباشرة direct analysis لهذه البروتينات أومعرفة ترتيب الأحماض الامينيه عن طريق معرفة ترتيب القواعد العضويه النيوكليوتيدات للحمض النووى داى اكس ريبوزى DNA والحمض النووى الريبوزى RNA لأن كل ثلاثة قواعد عضويه تعنى حامض امينى معين ومن المهم معرفة نوعية الاحماض الامينيه وذلك لمعرفة بعض الاحماض الامينية الغير عادية التى توجد فى بعض أنواع من البروتينات التى تتحد مع بعضها فى صورة سلاسل بواسطة جهاز محلل الاحماض الامينيه Amino acid analyser . وبعد معرفة كيفية تتابع الاحماض الامينية فى السلسلة الببتيدية وكذلك نوعية هذه الاحماض فمن الضرورى ايضاً معرفة عدد السلاسل الببتيدية الداخلة فى تركيب جزئ البروتين وذلك قبل إختبار التحليل لمعرفة ترتيب الاحماض الامينية فى السلسلة الببتيدية. حيث من الممكن أن يحتوى البروتين على اكثر من نوع من السلاسل الببتيدية ، فيجب أن نفصل كل سلسلة عن بعضها ثم يتم فحص كل سلسلة على حدة وتسمى كل **سلسله بتركيب تحت الوحدة sebunit structure** ويتعرف على تركيب تحت الوحدات بتعيين وزنها الجزئى فى وجود محلول هيدروكلوريد الجوانيدين وذلك لتحطيم جميع الروابط غير التساهمية بين السلاسل الببتيدية ومحلول بيتا مركابتوإيثانول للتخلص من الروابط ثنائية الكبريت Disulphide bonds بين السلاسل ومن أبسط الطرق لمعرفة عدد تحت الوحدات لجزئ البروتين

١- طرق تعتمد على عدد الروابط المتكونة بين تحت الوحدات باستخدام مادة تفاعل مزدوجة الوظيفة مثل ثنائى مثيل سوبراميدات.
Dimethy & suberimidate

٢- بواسطة الحمل الكهربى بالجيل gel-electrophoresis

لإيضاح الاختلافات بين البروتينات يمكن ذلك عن طريق :

أ- تعين النهايات الأمينية والتهابات الكربوكسيلية لجزئ البرتين.

ب- عن طريق مايعرف بالخريطة البيتيدية peptide mapping حيث تعتمد على معرفة عدد الببتيدات فى محلول البروتين المتحلل بواسطة الانزيمات (تربسين والكيموتربسين) ومن هنا يمكن معرفة تتابع الأحماض الأمينية فى السلسلة البيتيدية بواسطة :

١- التحلل الجزئى للسلسلة بواسطة الانزيمات.

٢- فصل وتنقية البيتيدات.

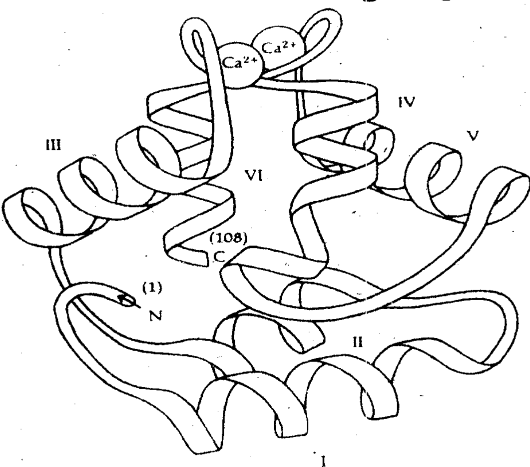
٣- معرفة ترتيب الاحماض الامينية فى البيتيدات.

٤- استنتاج الترتيب الكامل للبتيدات وكيفية تشابكها.

التركيب الثانوى للبروتين secondary structure

إن جزئ كبير كجزئ البروتين يمكن أن يفترض أن له العديد من الأشكال كلها ترضى التركيب الفراغى والاحوال التى تظهر الروابط غير التعاونية مثل روابـــط (S-S) والروابط الهيدروجينية والروابط الاسترية ولكن فى أغلب البـروتينات الخـام Native proteins فـإن مختلف الذرات والمجموعات والروابط فى السلاسل البيتيدية تحتل مواقع وأشكال وأوضاع مفضلة محددة فى الفراغ متصلة ببعضها البعض وخالقة لها شكل فراغى معين فى الفضاء conformation ويتضمن التركيب الفراغى الأوضاع النسبية للمجاميع الفعالة المتجاورة بين سلاسل البيتيدات وبعضها البعض وهى مايطلق عليه التركيب الثانوى للبروتين Secondary structure والتركيب الحلزونى (ألفا) اليمينى الاتجاه right handed & helix من اكثر التركيبات الثانوية للبروتين، ويدعم هذا الشكل الحلزونى بواسطة الروابط الهيدروجينية التى تحدث نتيجة استعداد ذرة الاكسجين فى مجموعةالكاربونيل فى الرابطة البيتيدية

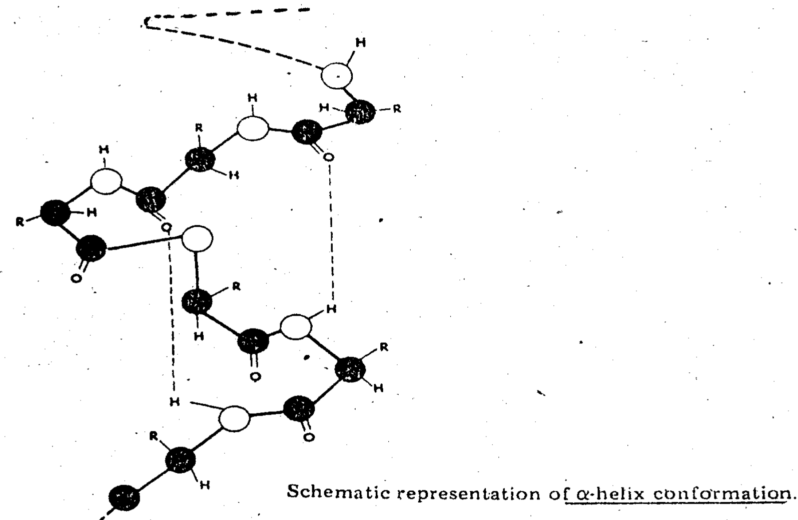
لإستقبال الايدروجين على مجموعة N-H فينتجة الإلتفاف على شكل حلزونى ويعتمد الشكل الحلزونى على (الشكل الأولى) أى تتابع الاحماض الامينيه حيث تفضل بعض الاحماض لتكوين حلزون وأحماض أخرى لاينتج عنها هذا الشكل الحلزونى والشكل التالى يوضح طريقة الألتفاف للسلسلة الببتيدية المرتبطة بالكالسيوم.



شكل إيضاحى لطريقة الإلتفاف فى سلسلة عديدة البروتين المرتبط بالكالسيوم فى الشبوط . ويرمز إلى النهايات الأمينية والكربوكسيلية بالأرقام ١ ، ١٠٨ على التوالى هذا ولا تظهر المجموعات (R)

التركيب الثلاثى للبروتين Tertiary structure

ويعنى الانثناءات الكليــة لسلسلة البــروتينات over all folding of proteins مثل الانثناءات الحلزونية الحادثة عند روابط الببتيد بين مجاميع الأمين NH2 والكربوكسيل COOH وتكون بزوايا مقدارها ٤,٥ A انجستروم كما فى الشكل التالى .



Schematic representation of α-helix conformation.

وتسمى هذه الروابط المكونة للشكل النهائى للتركيب الثلاثى للبروتين بالروابط غيرالتساهمية بين الحلزونات الفا و بيتا conformation مع السلاسل الجانبية من العوامل المحددة α-helix and B-stractures لتكوين التركيب البنائى الثلاثى وجود الروابط الهيدروفوبية hydrophopic الناتجة من وجود الشق (R) غير القطبى وللسبب السابق يكون التركيب الثلاثى الطبيعى فى حالة اتزان ديناميكى عكسى مع الاحتمالات التركيبية الأخرى.

ويتأثر هذا الاتزان بالـ pH، المكونات التركيبية، درجة حرارة الوسط.

التركيب البنائى الرباعى للبروتين Quaternary structure

ويعنى الشكل الفراغى للبروتين فى الفضاء ويشمل الاتحادات غير التعاونية noncovalent للعديد من سلاسل البيتيد المكونة لتحت الوحدات subunit مع تحديد ترتيب الأحماض الأمينية فى البروتينات لأن لها تأثير كبير ليس فقط على التركيب الثنائى والثلاثى للبروتين ولكن أيضا تؤثر على التركيب الرباعى للبروتين ويمكن معرفة التركيب الرباعى للبروتينات باستخدام الميكروسكوب الالكترونى للجزئيات الكبيرة التى تحتوى على العديد من تحت الوحدات Sub units .

الباب الرابع

الطرق الاساسية لفصل وتفريد البروتينات

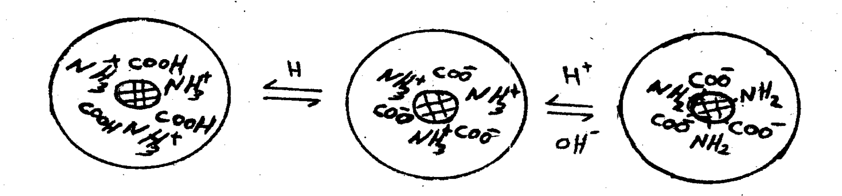
prinicple methods for separation and fractionation of proteins

خلال العشرين سنة الأخيرة نجد أن كيمياء البروتينات قد تطورت تطوراً خطيراً بواسطة تقدم طرق التحليل الكيميائى وبدخول طرق التحليل التى تعتمد على أسس علمية جديدة مثل :

١- التحليل الكروماتوجرافى   ٢- التحليل الكهربى

٣- تقدير النهايات الامينية   ٤- دراسات المناعة

ويوضح الرسم التالى الصورة الأيونيه المختلفة للبروتينات وقد سبق شرح ذلك فى حالة الاحماض الأمينيه .



الصورة الكاتيونية   zwitter ion   الصورة الانيونية

Cationic form   Anionic form

ومنذ قرن مضى كان التقدم فى علوم الحياة بطئ جداً ثم بدأت الدراسات المنتظمة للبروتين وهذا يعنى حل مشاكل كيماوية وفسيولوجية وصيدلانية عديدة وكان التقدم فى دراسة البروتينات تقدماً كبيراً.

وتتغير هذه البروتينات بعوامل عديدة مثل الاحماض والقلويات والحرارة التى تعرضها للدنتره أثناء فصلها ومنذ عشرون عاماً تقريباً تقدمت طرق تحليل البروتينات تقدماً ملموساً وتم اكتشاف التركيب الأولى Primary structure للعديد من البروتينات النباتية والحيوانية ولكن حتى يومنا هذا فإنه من الصعب جداً معرفة التركيب البنائى الكامل للعديد من البروتينات المعقد معرفة كاملة .

وبفضل التقدم فى طرق التحليل فإن دراسة التركيب الجزيئى للبروتين قد حظيت بإهتمام فى الكيمياء العامة والكيمياء الحيوية والطب ونهتم فى هذا الجزء بدراسة طرق فصل وتحليل البروتينات والأسس العلمية لها.

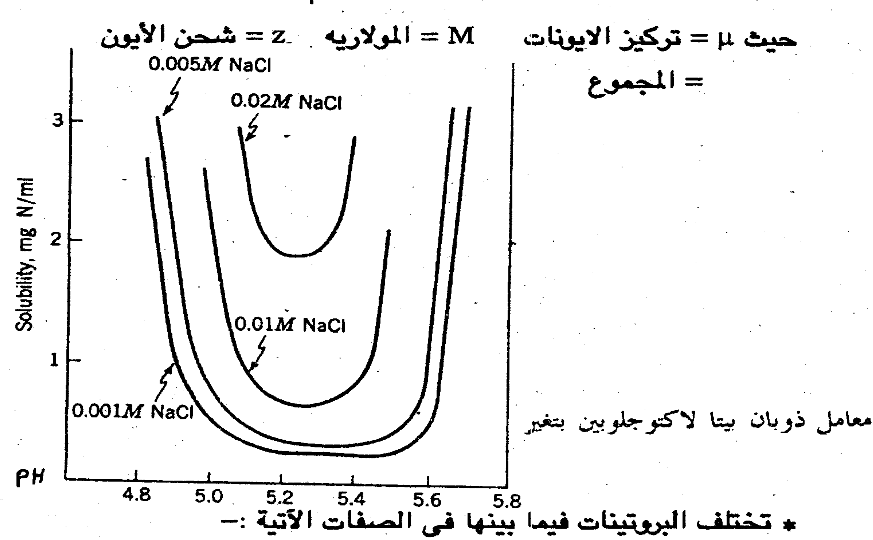
ذوبان البروتينات : Solubility of proteins

وقد وجد أن لكل بروتين خاصية ذوبان معينة فى المذيبات المختلفة (من ماء - أملاح متعادلة - أحماض - قلويات - مذيبات عضويه) ويتأثر ذوبان البروتين بالأس الهيدروجينى PH ويكون ذوبانه عند حده الأدنى عند PIE نقطه تعادلة الكهربى ويزداد كلما بعدنا عنه وتعليل ذلك بأن قوى التنافر تكون عند الحد الأدنى ، بينما تكون قوة الشبكية البلورية عند حدها الأقصى، بينما على العكس من ذلك تكون البروتينات أكثر ذائبية كلما بعدنا عن قيمة PIE الــى اطراف المنحنى ويظهر ذلك واضحا فى ذوبان مركب البيتالاكتوجلوبولين BLg - B-lactoglobin والذى نقطه تعادله الكهربائى عند PH ٥,٢ ويكون اعلى ذوبان له عند طرفى المنحنى عند PH ٥,٧ ، ٤,٨ وتعنى كلمة salting in زيادة ذوبان البروتينات فى الحدود الدنيا من التركيزات للاملاح لزيادة ذوبان مركب Blg عند زيادة تركيز ملح كلوريد الصوديوم من ٠,٠١ M إلى ٠,٠٢ M ومولر وتفسر ظاهرة الـ(salting in) : بأن الأملاح المتعادلة تتفاعل مع المجاميع الايونية للبروتين مما يؤدى إلى الاقلال من التفاعل البينى بين جزئيات البروتين وبعضها ومن ثم يزيد ذوبان البروتينات.

$\mu =$ Mz2.

حيث μ = تركيز الايونات M = المولاريه z = شحن الأيون

= المجموع



معامل ذوبان بيتا لاكتوجلوبين بتغير

* تختلف البروتينات فيما بينها فى الصفات الآتية :-

١- مقدار الشحن على الجزئ (charge) .

٢- توزيع الشحن على الجزئ (distibution of charge) .

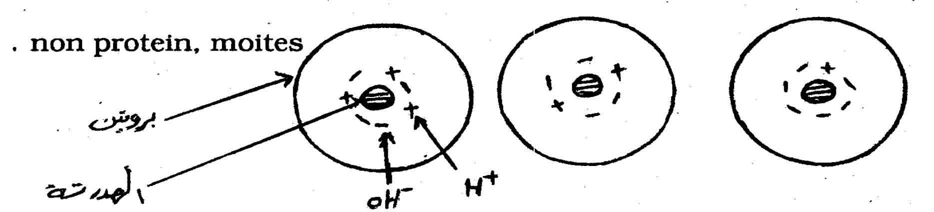
٣- التأدرت (Hydration) . ٤- كثافة البروتين Denisty.

٥- الحجم النوعى للبروتين specific volume.

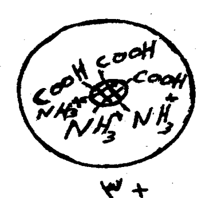
٦- نوع المجاميع المتخصصة الموجودة عليه. ٧- الثبات Stability.

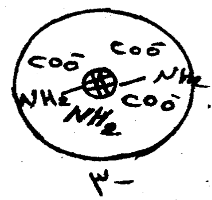
٨- وجود أجزاء غير بروتينية متصلة بالجزء البروتينى

. non protein, moites



رسم تخطيطى يوضح الإختلاف بين البروتينات من حيث الحجم، الشكل والهدرته – الشحنة – كثافة الشحنة – الـpH – وجود مجاميع فعاله.





+٣   صفر   -٣

الصورة الكاتيونية   الشحنة الصافيه+٣-٣= صفر   الصورة الانيونية

رسم تخطيطى يبين تأثير الأس السالب لتركيز أيون الهيدروجين على الشحنة النهائية على جزئ البروتين .

الطرق المختلفة لترسيب البروتين :

تفصل البروتينات تبعاً للأسس العلمية الآتية :-

١- إختلاف ذوبانها فى الأملاح المختلفة ذات القوه الأيونيه المختلفة أو إختلاف ذوبانها فى المذيبات العضويه.

٢- التحكم فى الشحنة التى على الجزئ من حيث مقدارها – توزيعها Control of charge.

٣- درجة التأدرت Hydration : وهى عبارة عن كمية الماء المحيط بجزئ البروتين والتى ترتبط بالروابط الهيدروجينية والأيونيه والروابط الاخرى.

٤- وجود مواد غير بروتينية معها مثل مجاميع الفوسفات، الدهن، والكوليسترول وهى مواد غير محبه للماء (Hydrophobic) والكربوهيدرات الذائبة .

– ولترسيب البروتين فإنه يجب التحكم إما فى مقدار الشحن أو فى التأدرت أو فى جميع الإعتبارات السابقة .

أولاً : الإختلاف فى البروتينات الذائبة فى الأملاح والمذيبات العضوية.

ثانياً : التحكم فى مقدار الشحنة على الجزئ Control of charge

تقدر الشحنة على جزئ أى بروتين بعدد المجاميع الحامضيه الحره (-coo) الناتجة من الأحماض الأمينية مثل الجلوتاميك والأسبارتيك أو المجاميع القاعدية الناتجة من الأحماض الأمينية القاعديه مثل مجموعة الأمين التى فى الوضع إبيسلون ع فى الحامض الأمينى ليسين (+NH3) أو مجموعة الجوانيدنيو فى الحامض الأمينى أرجينين أو حلقة الهستا زول فى الحامض الأمينى هستيدين أو المجاميع الأخرى المتدليه فى المحلول مثل مجاميع الفينايل فى النيروزين أو مجموعجة الإندول فى حامض التريبتوفان ومجاميع الهيدروكسيل فى الأحماض الأمينية الهيدروكسيليه هذا علاوة على النهايات الأمينية والنهايات الكربوكسيليه.

وكنتيجة لخواص هذه المجاميع فإنها تكون متجهه إلى الخارج وبعض هذه المجاميع محبه للماء (-Coo) ، (+NH3) .. الخ فإنها تكون متجهه إلى الخارج، لكى تكون درجة حموضة الوسط المائى ويمكن أن تتغير قيمة الشحنة على الجزئ بواسطة تغيير درجة الـ (pH) وعلى الـ (pH) المنخفضة عن نقطة التعادل الكهربى للبروتين (p.I) فإن البروتين يحمل شحنة صافية موجبة وتكون مجموعات الأمين (+NH3) وكذلك المجاميع الموجبة الأخرى وعلى العكس على درجـــة (pH) أعلى من نقطة التعادل الكهربائى للبروتين يكون البروتين محمل بشحنة سالبة (-Coo) .

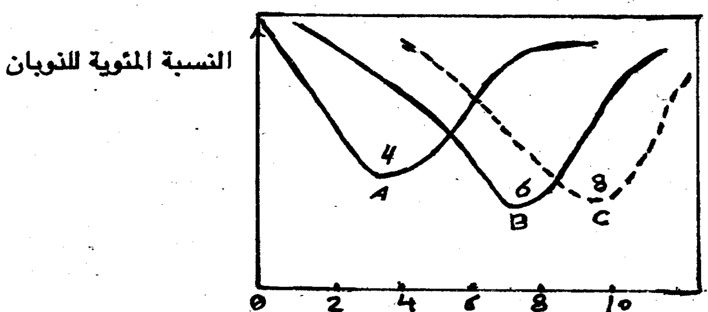
نقطة التعادل الكهربائى للبروتين :: Iso electric point of protein

هى تلك النقطة التى تتعادل فيها عدد الشحنات الموجبة مع عدد الشحنات السالبة وتكون الشحنة الصافية تساوى (صفر).

– هذا ويمكن ان نقوم بترسيب أى برتين عند نقطة تعادله الكهربائى

فعلى سبيل المثال تكون نقطة تعادل الكازين وهو بروتين اللبن الرئيسى (٤,٦)، لكن اللبن الطبيعى يكون الـ (pH) له يساوى (٦,٦) وتكون البروتينات محملة بشحنة سالبة لذا يلزم لترسيبها إضافة أيون موجب وقد يكون هذا الأيون من حامض عضوى أو ملح أو معدن ثقيل . وعند الترسيب للكازين فى الصناعة يتم ذلك بإضافة حامض كمصدر لأيون الهيدروجين . فإذا كان الاستعمال للأغراض الغذائية فيستحسن إضافة حامض عضوى مثل حامض اللاكتيك أما إذا كان ترسيب البروتين بغرض تحضير الكازين البلاستيك فيمكن أن يكون مصدر أيون الهيدروجين (+H) حامض معدنى مثل حامض (HCL)

والشكل التالى يعطى أقل درجة نوبان لثلاثة أنواع من البروتيناتعند قيم (pH) مختلفة هى (8,6,4) على التوالى للبروتينات C,B,A .



فعند pH = 6 يكون B بروتين غير ذائب فيمكن فصله بينما C,A ذائبه ١٥ مره مثل البروتين B ويترسب البروتين عند أقل نقطة ذائبيه

Point of minimum solubility . وأن ذلك يعتمد على أمرين هامين هما : تركيزه ونوبانه كثيراً من البروتينات ترسب بواسطة ضبط الـ pH عند نقطة التعادل الكهربى (P.I).

– وتعتبر عملية معتاده لترسيب وفصل البروتينات وتفريدها عند قيم

الـI.E.P والتى تمثل الحد الأدنى للذوبان ولكن يمكن فصل البروتين فإنه يجب ان تضم عدة جزيئات بجانب بعضها لتكون التجمع الذى سوف يكون لإخفاء مجاميع فعال من البروتينات الغرويه وهذه يمكن ان تحدث بواسطة ضبط الـpH.

ثانياً : التحكم فى الهدرته Control of hydration

الذائبية تقدر بمدى الهدرتة للجزئ كلما كان الجزئ مشحون زادت درجة التأدرت هذه وتوجد مجاميع أخرى غير أمينية تؤثر مثل مجاميع الفوسفور والكبريت كذلك الكربوهيدرات (تزيد الهدرتة Hydrophili بينما الدهون تقلل الهدرتة كذلك فإن درجة الهدرتة يمكن تقليلها بتقليل الـPH ولتقليل الهدرتة يتم إضافة مواد تعمل على كسر الماء المرتبطة حول البروتين والمواد التى تستعمل فى مثل هذه الحالات هى كلوريد الصوديوم Nacl كبريتات الامونيوم $(NH4)2\ So_4$ كبريتات الصوديوم $Na\ SO_4$ مع كبريتات الماغنسيوم.

وكبريتات الامونيوم هى الأكثر شيوعاً لذوبانها فى الماء بسهولة.

الأملاح احادية التكافؤ اضعف من الثنائية التكافؤ والثنائية أضعف من الثلاثية والاملاح احادية التكافؤ غير مؤثرة فى ترسيب البروتين ويختلف ترسيب البروتين من ملح إلى ملح ومن بروتين إلى بروتين . وهذه الأملاح لها قدرة إرتباط بجزئيات البروتين أكبر من الروابط الهيدروجينية والروابط الايونية فتقوم بجذب الماء من جزئ البروتين .

الترسيب بالمذيبات العضوية : Precipitation by organic solvents

يجرى على درجات حرارة منخفضة فتبرد المادة العضوية إلى ٥م ومحلول البروتين على صفر°م ويضاف المذيب بالتدريج حتى التركيز المطلوب ويكون ذلك وفقاً للمعادلة الآتية

$$F = \frac{Z^+ \times Z^-}{Dr2}$$

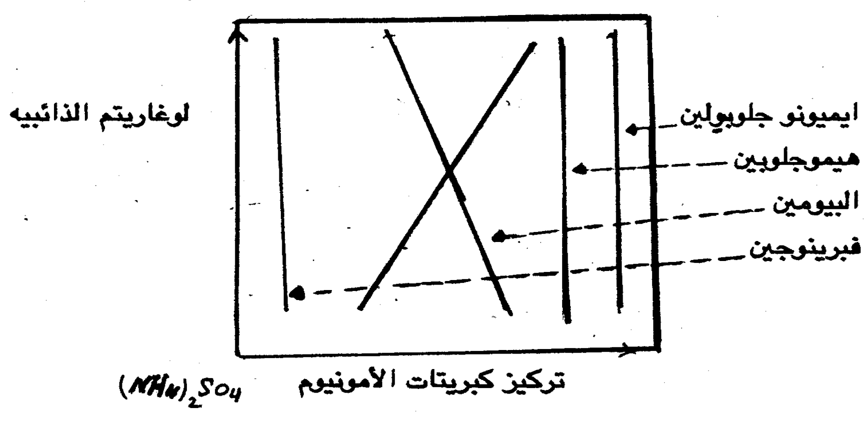
حيث Z^+ صافى الشحنات الموجبة، Z^- صافى الشحنات السالبة

معامل الجذب المؤثر = F ، D ثابت ، r^2 مربع المسافة بين الجزئيات ، D يسمى electric constant وهو معامل ثابت لكل وسط من الأوساط (ماء=٨٠) (وللاسيتون ٤٠) وهذا ويمكن عن طريق تقليل D عن طريق إضافة الاسيتون فى ترسيب البروتينات ويسمى الفصل بواسطة المذيبات العضوية وتزيد قيمة البسط إلى القيمة التى تصل إلى حد الترسيب .

ومن المهم ضبط كل من الـPH والاملاح الغير عضوية فى تركيزات منخفضة بواسطة زيادتها للشحنة المؤثرة على جزئ البروتين.

تأثير القوى الايونية : Effect of Ionic stregth

وفى هذا النظام فى الشكل الآتى يترسب الـ Fibrionogin فى تركيز من كبريتات الامونيوم بينما يبقى جميع البروتينات الأخرى ذائبة بينما أيمينو جلوبيولين يترسب عند تركيز تكون كل البروتينات قدر ترسبت . ومن هذا يتضح أنه يمكن أن نحصل على هيموجلوبين وفبرينوجين من مخلوط هذه المكونات وخالى من التلوث بواسطة عملية Salting out .



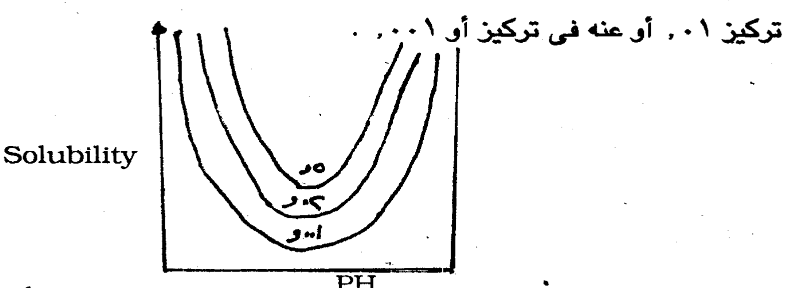
$$Log\ S = B - Ks\mu$$

حيث S ذوبان البروتين   B ثابت للبروتين فى غياب الأملاح ويعتمد على طبيعة البروتين.

Ks معامل الترسيب (طبيعة الملح)

μ القوة الأيونية

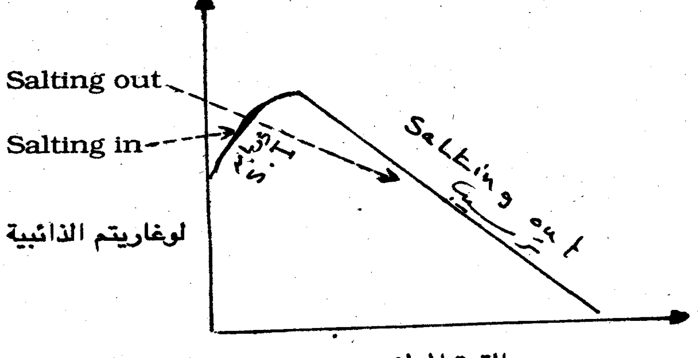
وهناك نقطة فى حالة القوى الايونية الضعيفة يمكن توضيح ما يسمى بـ Salting in نجد أن ذوبان البيالاكتوجلوبيولين أعلى فى تركيز ٠٢, عنه فى تركيز ٠١, أو عنه فى تركيز أو ٠٠١, .



تغير الذائبية فى حدود القوة الأيونية

ومن الشكل السابق نلاحظ تأثير تركيز ملح كلوريد الصوديوم على ذوبان الـ بيتالاكتوجلوبيولين حول نقطة التعادل الكهربى. بزيادة القوى الايونية عن نقطة القوى الايونية الضعيفة فإننا نصل إلى النقطة التى يكون عندها البروتين أقل ذائبية وفوق هذه النقطة فإن ذوبان البروتين يقل وهناك عدد من العوامل الهامة التى تؤثر فى الذوبان أو التخزين مثل الحرارة والـPH وطبيعة البروتين وطبيعة الملح وتركيز البروتين يؤثر على كل من الثوابت Ks, B .

ويتضح من الشكل الآتى العلاقة بين الذوبان وتركيز الملح كما هو معبر عنها بالقوة الايونية.



فنجد أن الحرارة والـPH تؤثر على B ثابت البروتين فى غياب الاملاح أما عند زيادة الحرارة وتغيير الـPH فإن الـPH الحد الادنى من الذوبان يزيد وتزيد قيمة B ولكن الميل ثابت ويسمى Ks ثابت B يتاثر على حسب (طبيعة البروتين – تركيز البروتين ومن هذا يمكن استخدام الثابت فى عملية فصل البروتين من مخلوطها. B تعتمد على طبيعة البروتين أما طبيعة الملح فتؤثر على Ks فيجب التنويه للباحث عند فصل وتنقية البروتينات بتثبيت تركيز الملح المطلوب لعمليات الفصل أما النتائج التى يحصل عليها من المراجع انما هى دليل فقط يعمل على إرشاد الباحث .

فقد يعمل الباحث بأمانة تامة فى ضبط الـPH والحرارة لكن ضبط تركيز البروتين ليس عملية سهل الحصول عليها بدون إجراء تحليل النسبة النيروجين بكلداهل والتى يعتبر عملية مجهدة لكل خطوة من خطوات التحليل.

وتقترح طريقة للحصول على تركيز الملح اللازم هو أن يوضع فى كميات متساوية الاملاح فى عدة انابيب مع ضبط الـPH عند نقطة الحد الأدنى من الذوبان والتى هى نفسها تقريبا I.E.P عند صفر°م ويضاف الملح الصلب وتترك الانابيب من ٣٠-٦٠ق وتطرد مركزيا ويعاد ذوبان الراسب فى محلول

منظم وقياس تقدير البروتين فى الرائق والراسب ويجب ان يكون مجموعهم حوالى ١٠٠٪ وإذا زادت عن ذلك نتيجة تداخل بروتين غير مرغوب فيجب إجراء عملية إزالة الملح عن طريق عملية Dialysis . كذلك يمكن ترسيب البروتينات بواسطة المعادن الثقيلة مثل CU والزئبق والرصاص والزنك. وكل البروتينات بدون استثناء ترسب مع المعادن الثقيلة بل ان بعضها يرسب على تركيزات بسيطة جداً من المعادن وعلى سبيل المثال الكازين أقل ذوبان فى وجود تركيزات عالية من CaCl2 ٥, مولر ، ٢٥, مولر .

الباب الخامس

التحليل الكهربى للبروتين الخام

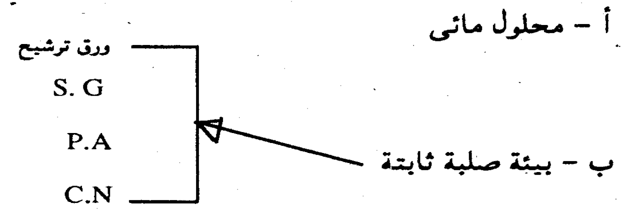
يختلف محتوى السيرم من البرتينات تبعا لاختلاف الظروف الفسيولوجية أختلافا بسيطاً. وهذا ينطبق أيضا على نسبة الآلبيومين ، هذا وتقدير نسبة الالبيومين والجلوبيولين بواسطة الترسيب الجزئى و قد أخذ يفقد أهميته وهذا يرجع إلى التغير الحادث فى الظروف المرضية وقد لا يدل على العديد من التغيرات الكمية الوصفيه والتى تحدث فى العديد من بروتينات السيرم والتى لها العديد من الوظائف وقد يكون هناك العديد من الأجزاء fractions قد قلت أو زادت أو تكون غائبة تماما فى الدم بدون التغير الكمى فى البروتين الكلى أو فى نسبة

$$\text{الآلبيومين إلى الجلوبيولين} = \frac{(ALb)}{Glob}$$

ولهذا كان من المهم جدا تحليل بروتينات السيرم العالم Tizlius بواسطة التحليل الكهربى وتعتمد هذه الطريقة على قيمة الشحنة الكهربية النهائية على جزئ البروتين وتعتمد الشحنة على PH الوسط قد تكون شحنة سالبة (-) أو موجبة (+) وتتحرك ناحية anode القطب الموجب وتسمى بطريقة anaphoresis أو ناحية القطب السالب Cathode وتسمى العملية Cataphoresis والتحليل الكهربائى Electrophoresis يفيد فى عمليات تقدير نقاوة البروتين أكثر منها فى عمليات الفصل ، على الرغم من وجود تجارب والتى يمكن بها فصل كميات ضئيلة من البروتينات على خطوة واحدة والفصل بالأكتروفورسيس يعتمد على

أساس كثافة الشحنة - توزيع الشحنة وشكل وحجم الجزئ (فى حالة النشا والبولى أكريل أميد P.A .A والشحنة على الجزئ يمكن أن تتغير بتغير قيمة الـ PH للمحلول .فعند زيادة الـ PH تقل الشحنة علي الجزئ حتى = صفر والهجرة = صفر وهى نقطة التعادل الكهربائى للبروتين I.E.P وعند PH تحت هذه النقطة فإن الجزئ يكون عليه شحنة (+) ويهاجر البروتين كأنيون وأعلى من هذه النقطة يزداد هجرة ككاتيون وإذا حاولت رسم علاقة بين E.M - PH الهجرة الكهربائية فإن الشكل للمنحنيات سوف تكون مختلفة يمكن تقسيم طرق الألكتروفورسيس على أساس نوع البيئة التى يتم فيها الفصل إلي :

أ - محلول مائى



<u>الفصل الكهربائي في محاليل السوائل</u> Free Boundary Electrophoresis

يرى فى شكل التجربة لـ F.B.E أنه عند مرور تيار الالكترونات (+) فإن الكاتيونات تتحرك نحو القطب السالب cathode والآنيونات (-) تتحرك نحو القطب الموجب anode وكما هو الحال فى عملية الطرد المركزى فإن معدل الهجرة للجزئيات يمكن قياسها بواسطة قياس التغير في معدل الانكسار Refractive index بواسطة نظام Schlieven optic ويرى

بالشكل التحليل الكهربائى التصاعدى لعينة من سيرم دم الانسان .

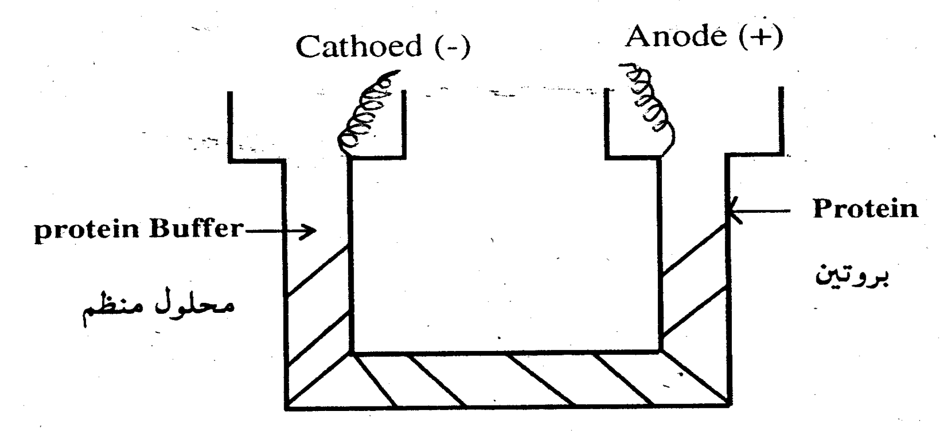
$$\text{الهجرة الكهربية للبروتين} = \frac{\text{معدل التوصيل} \times \text{قطاع عرضى في الخلية} \times \text{المسافة بالسم}}{\text{شدة التيار الواصل} \times \text{الوقت (ثانية)}}$$

أى أن :-

$$R.M = \frac{KPXAD}{IXT}$$

حيث KP ثابت التوصيل النوعى للبروتين — AD القطاع العرضى فى الخلية

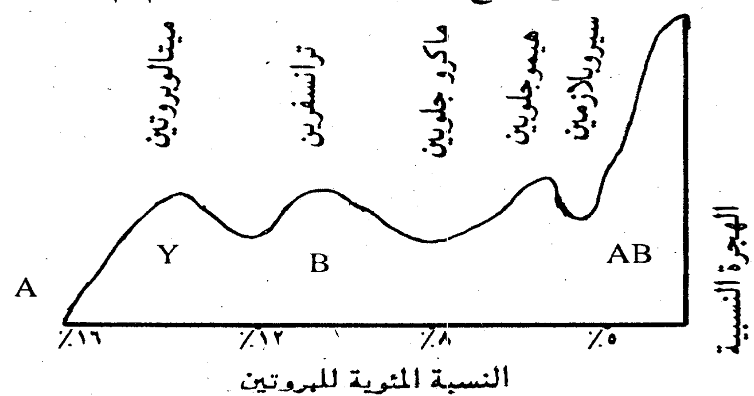
I شدة التيار بالأمير — T الوقت (ثانية)



والشكل السابق يوضح عملية ترتيب الخلية للفصل

خلية السليكا محمولة من ثلاثة قطع لتسمح بتكوين حزم حاده من المحلول المنظم ومحلول البروتين ويتم ترتيب البروتين فى اتجاه التيار.

والشكل التالى يوضح البروتينات الموجودة فى سيرم دم الانسان



Zon Electrophorisis

يستعمل بيئة stabilizing medium والتى فيها تحدث هجرة جزئيات البروتين بتأثير تيار كهربائى موحد وإن اكثر البيئات المساعدة شيوعا هى :-

١- ورق السيليلوز أو الترشيح .   ٢- سيليلوز ثلاثى الخلات .

٣- النشا (S.G) stagrch   ٤ - بولى اكريل اميد

Poly A cry Amid gel = P.A.A

ويكون ورق السيليلوز مفيد جدا فى حالة فصل المركبات ذات الوزن الجزئى الصغير مثل الاحماض الأمينية (Amino Acids)والببتيدات وليس مفيد فى

حالة البروتين وذلك بسبب الأدمصاص لهم على السيليلوز وبذلك سوف توجد فى ١٦ ساعة على ٢٠٠ : ٤٠٠ فولت ويمكن أن يتم الفصل على شرائط سيليلوز ثلاثى الخلات فى ١:٢ساعة وقدرات الفصل لعدد من البيئات المساعدة ويقدم P.A.A أقصى resolving power من الفصل بواسطة الـ Zoneoresis electroph فإن موضع البروتين يمكن أن يوضع بواسطة الأميدوبلاك - فى حالة الإنزيمات يكون بواسطة قياس نشاط الإنزيم أو Immunology بواسطة مولدات العصارات ومضات الإجسام antigeh-antibody ويمثل الأميونولوجى Immunology أكثر الطرق تميزا حيث أن الأميدوبلاك يصبغ كل البروتينات .

مميزات الـ Zone على الـ M.R.E :-

١- سهل الاجراء .

٢- الكمية المطلوبة من المادة لإجراء الاختيار صغيرة حيث إن استعمال الـ M.B.E الاكلينيكية البروتينية زادت صعوبتها الاحتياج الى كميات كبيرة من الدم وقت إجراء التحاليل فى أجهزة ميكرو أو سنتيميكرو.

مثال : يحتاج التحليل الكهربائى على الورق الى ٥,-٨,مجم والـ P.A.A يحتاج الى ١,- ٢, Mg وعلى ذلك يمكن زيادة عدد التجارب .

٣- الروتينات المنفصلة يمكن صبغها على البيئة الحاملة بواسطة طرق صبغ مختلفة ولقد امكن لبعض الطرق التى تصبغ بها البروتينات الدهنية -Lipop Protein والبروتينات المحتويات على كربوهيدرات فمن السهولة فصل هذه البروتينات وتقديرها بل وأصبحت طرق تقديرها عملية اكلينيكية روتينية في

التحاليل الطبية لتمييز العديد من الامراض عن طريق طرق الصبغ المتخصصة مثل : الترانسفيرين – هيموجلوبين – سيروبلازمين .

٤- عدد الجزيئات الـ Fraction المفصوله عليها يمكن زيادتها عن طريق المحول المنظم – بيئة الفصل .

مثال : يمكن فصل الكازين الى α, β, γ, K كازين على ورق الترشيح عند PH=8.6 فى محلول منظم فيرونال ولكن الى أكثر من ٢٠ حزمة بواسطة S.G.E فى وجود اليوريا Tris . EDTA محلول منظم (النشا)

٥- فصل البروتينات يتم بسرعة جدا فبعض الطرق لا تأخذ أكثر من ١:٢ ساعة مع الصبغ .

٦- بالاضافة الى طرق صبغ البروتينات فان labeled protein (البروتينات المعلمه) بالنظائر المشعة radio active يمكن تقديرها بأجهزة النشاط الاشعاعى .

٧- فى حالة الانزيمات المخلقة المفصولة يمكن تقديرها عن طريق تفاعلاتها المميزة

عيوب طريقة الـ zone electrophorsis الآتى :-

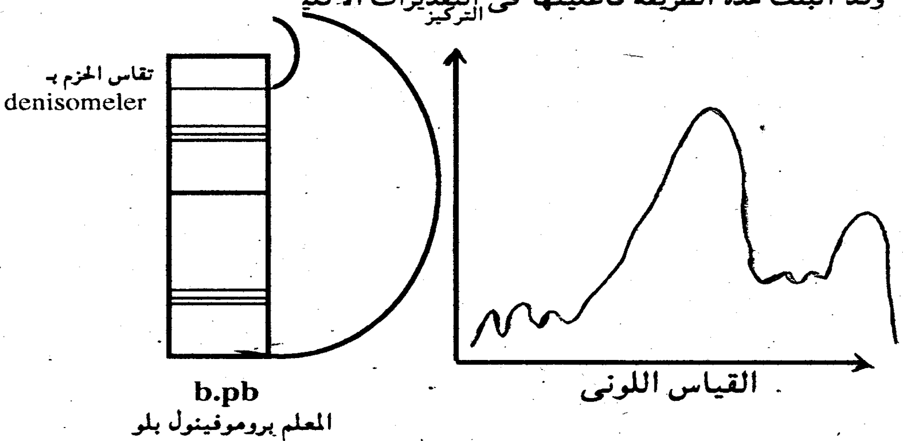
١- لا يمكن تقدير معدلات الهجرة النسبية مباشرة .

٢- التداخل بين البيئة والبروتين مما يسبب إدمصاص جزئى لبعض البروتينات فى حالة الفصل على الورق وتقل العملية فى حالة السيليلوز ثلاثى الخلات وتنعدم فى حالة الآجار.

١ - التحليل الكهربائي على الورق paper electrophoresis

هو من أوسع الطرق انتشارا والذى يكون فيه الحامل عبارة عن شريط بسيط من ورق الترشيح وورق الترشيح المناسب يجب أن يكون هيجروسكوبيك ماص للرطوبة ويحتفظ بها scopicoHygr ويدمص حوالى (١٣٠ : ٢٠٠) مرة قدر وزنه من الماء ويكون محتواه من الرماد (٠,٠٧:٠,٠٥)جم لكل (١٠٠) جرام ومحتواه من النيتروجين لا يتعدى ١٠٪ ويستغرق الجريان الواحد من (٤:١٦) ساعة ويعتمد ذلك على نوع الجهاز ، ويفصل سيرم الدم الى (٥) أجزاء والكازين الى (٣) أجزاء ويمكن الصبغ مباشرة بعد تثبيت البروتين .

- كما يمكن إزالة الأجزاء المفصولة وتقديرها بطرق (photoelectric) وقد أثبتت هذه الطريقة فاعليتها فى التقديرات الاكلي



٢- التحليل الكهربائى بالنشا S.G.E

يتميز الفصل باستعمال النشا بزيادة القوة الاحلالية greater resolution وترجع هذه القوة الاحلالية العالية الى molecular seiving بواسطة هذه القوة الاحلالية العالية فانه يمكن الحصول على العديد من الاجزاء (Franction) من (٨: ١٠) للسيرم و (٢٥) للكازين . علاوة على أن بعض البروتينات تكون متجانسة التحليل على الورق لذا وتعتبر طريقة الـ (S.G.E) مهمة جدا فى :-

أ- دراسة تجانس البروتين . ب - دراسة التحت وحدات Subu-nites التى يتكون منها البروتين ، ويحد من إنتشار هذه الطريقة تعقد النشا وتحضيرة .

٣- التحليل الكهربائى على الأجار (Agr ele (A.G.E

أثبت الآجار أنه حامل ممتاز فى طرق الفصل بواسطة الـ Zone electro-phorasis بتركيزات (١-٥, ١) ٪ وبظروف هجرة كما هى فى الـ M.B.E ويتميز على الهجرة على الورق بالتالى :-

١- سرعة إجراء التقدير ٢- قدرة احلالية عالية
٣- يوجد ظلال (Tailing)
٤- قدرة صبغ عالية والشفافية مما يمكن من حساب التركيزات أسهل من الورق
٥- يمكن استعمال حجم عينة أكبر دون أن يؤثر فى عملية الفصل .

عيوب الجريان الكهربى على الآجار (A.G.E)

١- إعداد الآجار بجهد عن إعداد الورق .
٢- إختيار الآجار المناسب : حيث أن نوع الآجار يحدد الهجرة

النسبية (Relative Mobility) .

٣- إحتواء الآجار على نسبة من البكتين مما يحول الى آجار وبكتين حامضى وهذا الاجار يكون معقدات مع الليبوبروتين ومع البروتينات القاعدية مثل الإميونوجلوبيولين (I.G.G)، وهذا يؤثر على معدلا ت الهجرة .

٤- الشحنة السالبة على الآجار تسبب تدفق الالكترونات التى بالمحلول المنظم والماء نحو المصعد (Anode) خلال الالكتروفورسيس وهذا يمكن منعه إذا بدأنا بوضع العينة في المنتصف وليس عند القطب السالب (Ando) ولا يوجد هذا التأثير فى:-

أ - الآجار النقى . ب- ورق الترشيح . ج- خلات السيليلوز.

Cellulose acetate membrane electrophorisis (C.M.E)

وهو فرع جديد من الالكتروفورسيس ولقد أثبتت أنه حامل ممتاز وأصبح منتشر الاستعمال وله مميزات عديده فبينما إعداد كل من النشار والاجار صعب مما يسبب فى تحديد استعمالهم فإن طريقة غشاء خلات السيليلوز تقريبا نفس طريقة الجريان والكهربائى على شريط الورق وفى نفس الوقت يمكن الفصل عليه أفضل وأسرع ويتم فصل من (٥ : ١٠٠٠)MG فى حدود من (١, : ١٥٠) ميكرومول وتكون كافية لإجراء التحليل ويمكن أن تستعمل هذه الطريقة فى فصل البروتينات والجليكوبروتين كما أنه بيئة ممتازة لإجراء التحليلات الكمية . وعدد البروتينات المفصولة عليها من سيرم الدم وسط فى العدد بين طريقة النشار وطريقة الفصل على ورقة الترشيح .

- وحساسية الطريقة لتقدير كميات صغيرة جداً صالحة لدراسة التجانس

(Homogenity)والنقاوة (purity) كما يمكن تطبيقها أيضا فى طرق الانتشار الـ(Immunodiffusion) .

Poly Acryl Amind Gel Electrophoresis (P.A.A)

على الرغم من حداثة عهد هذه الطريقة إلا انها إنتشرت إنتشاراً واسعاً فى فروع عديدة من الكيمياء الحيوية والحامل هى عبارة عن تجميع (Copolymer)من الاكريلاميد مع (Acrylamide) و (Bisacrylamide)

Acryl + Bisacryl —عوامل مساعدة→ poly acryl anide

وينتج عن ذلك بناء مسامى (porous structure) اكريل اميد المستقيم يحدث له تجميع أو تصليب أو تكوين شبكة ذات ثقوب ضيقة بواسطة كبارى من الميثيلين methylene bridges . وخواصه الهيدروفيلية (المحبة للماء) ترجع الى مجاميع الأميدو التي تتواجد على فترات منتظمة ويحدث التجمع بواسطة (Tetra methylene diaminpersulphate) T.M.D.A.P فى وجود الريبوفلافين الذى ينشط ضوئيا (بواسطة الضوء) . وكنتيجة للمسامية وخاصية نفاذية السوائل فان الجيل يعمل كمنخل للجزيئات (molecular sieve) وحجم الثقوب فى هذا المنخل يعتمد على تركيز الاكريل أو البيس أكريل أميد فيكون (٥ , ٧٪) أكرميد على ٥٠ مْ ويتميز البولى اكريل أميد على (S.G) بالاتى :-

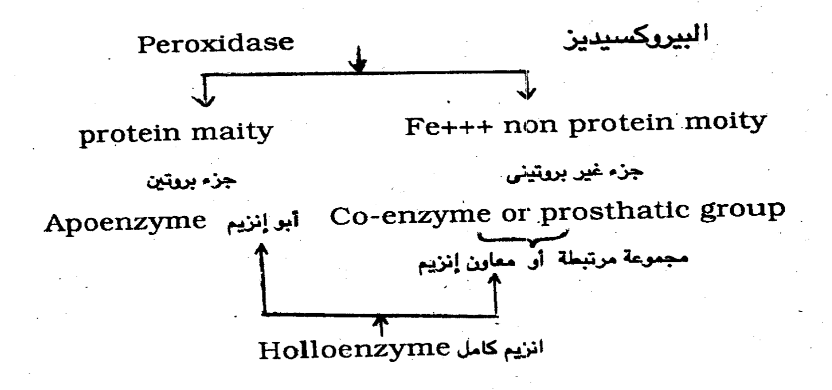
١- أكثر شفافية more transparent
٢- القوة الاحلالية أعلى higher resolution power
٣- بواسطة الـ disk يمكن استعمال (٥٠ : ٢٠٠) M.U لإجراء التحليل.

الباب السادس

الأنـزيمـــات Enzymes

تعريفات Definations

العامل المساعد catalyst هو عبارة عن مادة قادرة على زيادة سرعة التفاعل الكيماوى بدون حدوث أى تغير فيه بينما **الانزيمات Enzymes** هى عبارة عن بروتينات لها القدرة على إسراع تفاعلات كيموحيوية متخصصة معينة special biochemical reactions ويعرف الانزيم بطريقة أخرى بأنه Biocatalyst أى عامل مساعد كيموحيوى وتزن سرعة التفاعل بمعدل من ١٠^٦ إلى ١٠^٩ واقترح برزيليوس Berzelius سنة ١٨٣٦ كلمة عامل مساعد catalysts بأنها عبارة عن مواد قادرة على إحداث تفاعلات تتم فى ظروف قاسية فى انبوبة الاختبار in vitro أو فى ظروف بسيطة داخل الكائن الحى in vivo فعلى سبيل المثال فإن تحليل البروتين إلى أحماض أمينية يتم باستعمال محلول ٦ عيارى من حامض Hcl لمدة ٢٤ ساعة على درجة ١٠٠م° لكن ذلك يتم فى وجود الانزيمات المحللة للبروتين على درجة حرارة الجسم فى ٢-٣ ساعات وقد أرجع برزيليوس هذه الظاهرة فى حينة إلى قوى غامضة mysterious أو catalytic power وهذا الاعتقاد بوجود العوامل المساعدة الغامضة استمر لفترة طويلة حتى بعد فصل العديد من الانزيمات وعندما حاضر ويليستيتر willstaetter سنة ١٩٢٦ فى الجمعية الكيماوية الالمانية عن طرق فصل الانزيمات خاصة إنزيم البيروكسيديز peroxidase الذى يتكون من جزء بروتينى protein moiety ويسمى Apoenzyme وجزئ غير بروتينى (الحديد) non protein moiety ويسمى مساعد الانزيم co-enzyme or prosthetic group والاثنان سوياً يطلق عليهما الانزيم الكلى holloenzyme



ويوضح هذا الرسم التخطيطى إقتراح ويلستيت willesteater لتكوين إنزيم البيروكسيديز peroxidase

واستطاع سومر summer ١٩٢٦ فصل انزيم اليورييز urease من الفول jack beams .

$$\begin{matrix} NH_2 \\ | \\ C=O \\ | \\ NH_2 \end{matrix} \xrightarrow[H_2O]{urease} 2\,NH_3 + CO_2$$

وبعدهم امكن النورثوب Northop ومعاونون فصل وبلورة الانزيمات المحللة للبروتين proteolytic Enzymes (البيسين pepsin) التريبسين الكيموتربسين ولقد شكلت العديد من العلماء فى هذه البلورات هى انزيمات ولكنهم بعد عشرين عاماً حصولا على جائزة نويل لهذا الاختراع (نورثوب northop) سانلس stanles وسومر summer، هذا ويمكن للتفاعلات الحيويه بواسطة الانزيمات ان تتم فى أنبوبة الاختبار in vitro وعلى سبيل المثال كما سبق ذكره تحليل البروتينات الى الاحماض الامينية بفعلها عدة

ساعات فى تركيزات عالية من الأحماض القلويات وتحويل النشا الى مكوناته من الجلوكوز ولكن هذه التفاعلات تتم فى ظروف هادئه بواسطة الانزيمات ولكن كيف سميت هذه العوامل المساعدة انزيمات Enzymes ؟!

لقد اشتقت هذه التسمية En-zyme بواسطة كون kuhne سنة ١٨٧٨ من الاسم اليونانى in yeast حيث كانت الانزيمات معروفه بتأديه عملها داخل الخليـــه فى ذلك الوقت (En + zyme = (in+yeast) ولكن بـوخـنـزر Buchners فى ١٨٩٧ وللمـــرة الأولى أثبت ان فـــعل الانزيمات لايكون بالضرورة داخل الخلايا الحيه بل يمكن أن يتم خارجها وكان ذلك عن طريق طحن خلايا الخميرة فى مطحن صينى مع استخدام الرمل ثم ترشيح هذا المحلول حيث يؤدى الطحن مع الرمل الى كسر جدر خلايا الخميرة وأنسياب عصيرالخميرة محتوياً على الانزيمات الى خارجها وعند ترشيح هذا المسحوق وخلطة مع أى محلول سكرى فإن ذلك يؤدى الى تخمر السكر إلى كحول الايثايل وثانى أكسيد الكربون وكان هذا يعتبر إكتشاف عظيم فى حينه حيث قضى لاول مرة على فكرة القوى الغامضة والمادة المتأثرة بواسطة الانزيم سميت بمادة التفاعل substrate بعد ذلك ثم فصل وتفريد بلورة العديد من الانزيمات وتم معرفة تركيبها الأولى والثانوى. ومعظم الانزيمات تقع تحت قسم البـــروتينات المرتبطة conjugated proteins كما سبق ذكره فتتكون الانزيمات من جزء بروتينى ويسمى الابوانزيم Apo enzyme ، جزء غير بروتينى non protein moety ويسمى المجموعة الفعال conenzyme or prosthetic group ويكون متصل بالبروتين إتصالاً بسيطا loosely ويمكن فصله بواسطة التحليل الغشائى Dialysis الأبوانزيم + معادن الانزيم يسمى سوياً الانزيم الكلى holloenzyme

طرق قياس النشاط الانزيمى : Enzyme activity

أنه من الصعب ولا معنى له أن تعرف كمية من الانزيم فى تحضير ما بتركيز الانزيم ولكن بقياس نشاط الانزيم أو معدل تفاعل الانزيم وهى عبارة عن نشاط هذا الأنزيم على مادة تفاعل محددة تحت ظروف محددة من الحرارة الحموضه أو الـPH أو تركيز ايونات معينة ويقاس نشاط الانزيمات بواسطة وحدات نشاط الانزيم activity units هذا ويمكن **تعريف وحدة نشاط الانزيم Enzyme activity unit** : بأنها كمية الانزيم التى سوف تحول ميكرمل من مادة التفاعل بمعدل كل دقيقة الى نواتج التفاعل تحت ظروف محددة (من حـــرارة ، PH، تركيز ايونات) وعند حسب عدد الوحدات تنسب الى عدد الوحدات الموجودة فى ١مجم /بروتين . وفى الصناعات الغذائية نجد العديد من وحدات الانزيم وقد تكون هذه الوحدات عشوائية أو وحدات رسمية ولما كان شيوع إضافة محاليل الانزيمات فى مصانع القطاع الخاص يتم بطرق وزينه او حجميه كأن يقول.أضف ١٠٠مل أو ١٠٠جرام من الانزيم المعين الى طن من مادة التفاعل والذى قد يختلف نشاطه تبعاً للتخزين او لطريقة التحضير فإنه من الأهمية أن نتحدث عن إضافة الأنزيمات دائماً على اساس حجم أو وزن معين والمعروف عدد وحدات النشاط فى الـ مل او مجم بروتين ولذا يجب ان نتحدث عن الوحدات العشوائية، والوحدات الرسمية .

وحدات الانزيم : Enzyme Units

أ- الوحدات العشوائية :Random units

لايختلف التركيب الكيماوى للانزيم الفعال عن التركيب الكيمياوى للانزيم غير الفعال، لهذا فليس بالامكان تقدير تركيز الانزيم الفعال بواسطة التقدير الكيماوى للانزيم ويجب اما استعمال الطرق النوعية التى تدلل على فعالية الانزيم وملاحظة التغيرات التى يحدثها فى المادة الخاضعة substrate او

استعمال الطرق الكمية بواسطة قياس سرعة التفاعل الذى يساعد فيه الانزيم . بناء على ذلك يتم التعبير عن تركيز الانزيم بوحدات الانزيم وتربط العلاقة بين وحدة الانزيم وبين سرعة التفاعل الذى يساعد فيه بطريقة عشوائية. فمثلاً تعرف وحدة انزيم اللايبيز المأخوذ من الفطر بأنها تلك الكمية من الانزيم التى تنتج كمية من الاحماض الدهنية مكافئة لـ ١ مل من ٠,٠٥ عيارى من هيدروكسيد البوتاسيوم تحت الظروف التالية :-

١- استعمال ١٥٪ زيت الزيتون كمادة خاضعة

٢- وقت التفاعل ١٥٠ دقيقة. ٣- pH مقدار ٥,٦ .

٤- درجة حرارة ٣٠ م.

ويطلق على هذا التعريف بأنه عشوائى لانه بالامكان اطالة او تقصير وقت التفاعل او استعمال محاليل قاعدية ذات عيارية مختلفة.

ويختار كل باحث فى معظم الحالات تعريفا يلائم ظروف التجربة التى قام بها وثبت نجاحها، وقد يختلف هذا التعريف جذريا عن التعريف الذى يستعمله باحث آخر. فمثلا يستعمل كل من زيت الزيتون والكليسريدات الصناعية وبيوترات المثيل كمواد خاضعة substrates للايبيز بوجود او عدم وجود زيوت مستحلبة وعلى قيم مختلفة من الـpH مع اوقات مختلفة للتحضين ، فى حالات اخرى قد تستعمل طرقا متشابهة فى تقدير فعالية انزيم معين، الا انه توجد اختلافات طفيفة.

ب- الوحدات الرسمية Official Units

قام الاتحاد العالمى للكيمياء الحيوية عام ١٩٦٥ بتعريف وحدة الانزيم كالتالى: الوحدة (U) الوحدة من أى انزيم هى تلك الكمية التى تقوم بدور العامل المساعد فى تحويل مايكرومول واحد من المادة الخاضعة Substrate فى الدقيقة تحت ظروف معينة.

جـ- الفعالية المتخصصة والفعالية الجزيئية :

Specific and Molecular Activity

إذا كان الانزيم نقيا فان الفعالية المتخصصة Specific activity عبارة عن عدد وحدات الانزيم لكل مليجرام من البروتين الانزيمي enzyme protein يستعمل مصطلح الفعالية المتخصصة ايضا اذا كان الانزيم غير نقيا وبنفس الطريقة، وفي هذه الحالة تعطى الفعالية المتخصصة دلالة على الخليط الذى يوجد فيه الانزيم وليس على الانزيم النقى. تساعد الفعالية المتخصصة (فى حالة معرفتها) لمستحضر انزيمى فى حساب درجة نقاوة الانزيم اذا كانت الفعالية المتخصصة للانزيم النقى معروفة. فمثلا تقدر الفعالية المتخصصة للالفا اميليز النقى المأخوذ من الفطر بـ ٥٠٠٠ وحدة اميليز/ملجم، اما الفعالية المتخصصة للالفا اميليز غير النقى والمأخوذ من الفطر والذى يستعمل على نطاق تجارى فتقدر بـ٥ وحدات اميليز/ملجم أى ان درجة نقاوة المستحضر التجارى تقدر بحوالى ٠,١٪.

فى حالة معرفة الوزن الجزيئى للانزيم . فبالامكان التعبير عن فعاليته بالفعالية الجزيئية molecular activity والتى تعرف بأنها عدد جزيئات المادة الخاضعة المتحولة فى الدقيقة لكل جزيئة من الانزيم. ويطلق على تعبير الفعالية الجزيئية للانزيم فى بعض الحالات برقم الانقلاب turnover numberومن الجدير بالذكر ان الفعالية الجزيئية للانزيم عبارة عن خاصية معينة لذلك الانزيم ولاتعكس درجة نقاوة الانزيم فى مستحضر ما.

نادرا ما يستعمل مصطلح الفعالية الجزيئية للانزيمات فى مجال الصناعات الغذائية بسبب ان المستحضرات التجارية للانزيمات المختلفة عبارة عن خليط من عدد من الانزيمات وتكون درجة نقاوتها منخفضة نوعا ما.

الباب السابع

تقسيم الانزيمات : Classification of enzymes

لايوجد نظام موحد لتقسيم الانزيمات حيث تقسم الانزيمات تبعاً للعديد من الاعتبارات مثل ١- التفاعلات التى تحفزها ٢- مادة تفاعل الانزيمات

ومعظم أسماء الانزيمات حتى اليوم تحتوى على إنزيمات ترجع إلى طرق غير منتظمة فى التنمية ترجع إلى أسماء مكتشفيها أو أسباب تاريخية ولكى تكون تسمية الانزيمات عملية قياسية standard لذلك قرر الاتحاد العالمى للكيمياء الحيوية سنة ١٩٦١ نظام جديد لتقسيم الانزيمات حيث تقسم الانزيمات إلى ستة مجاميع كما فى الجدول التالى .

تصنيف الإنزيمات

القسم	التأثير الإنزيمى
١ - إنزيمات الأكسدة والإختزال oxidoreductases	تحفز تفاعلات الأكسدة والإختزال . وفى هذه الحالات يمكن أن ينتزع الهيدروجين من المادة التى يؤثر عليها الإنزيم
٢ - إنزيمات النقل transferases	تحفز هذه الإنزيمات مثل هذه التفاعلات الآتية : $X\text{-}Y + Z \rightleftharpoons X + Z\text{-}Y$
٣ - إنزيمات التحلل المائى (التميؤ) Hydrolases	تحفز هذه الإنزيمات إنشطار الروابط الآتية بالإضافة إلى روابط أخرى ، وذلك بواسطة إضافة عناصر الماء : C—O, C—N, C—C
٤ - إنزيمات لاييز lyases	تحفز هذه الإنزيمات إنفصال الروابط الآتية C—N, C—O, C—C بالإضافة إلى روابط أخرى وذلك الإنفصال ، أو إضافة مجاميع إلى الروابط الثنائية .. إلخ
٥ - إنزيمات الإيزومير Isomerases	تحفز هذه الإنزيمات عمليات التغير الأيزوميرى
٦ - الإنزيمات الرابطة Ligases	تحفز هذه الإنزيمات عمليات ربط جزيئين كل منها بالآخر مع انشطار فى إحدى الروابط الغنية بالطاقة high-energy bond

وتشمل المجموعة الأولى الانزيمات الآتية :-

١- إنزيمات الاكسدة والاختزال oxidoreducetases مثل نازعات الهيدروجين dehydrogenases انزيمات الاختزال reductases ، انزيمات الاكسده oxidase الأكسدة بالأوكسجين oxygenases.

٢- إنزيمات النقل transeferase حيث تساعد فى نقل العديد من المجاميع مثل مجاميع الفوسفات phospate والأمين amine والكيتون ketone الالدهيد aldeheyde والاستيل acetyl ، والميثيل methyl وذلك من مادة إلى أخرى

٣- إنزيمات التحلل المائى Hydrolases مثل الليبيز lipases المالتيز maltases والاميليز amylase،البكتينيز pectinesterase ، البروتين proteinases

٤- إنزيمات لايبيز lyases وتشمل carboxy-lyases الالدوليز aldolases الهيدريتيز hydratase.

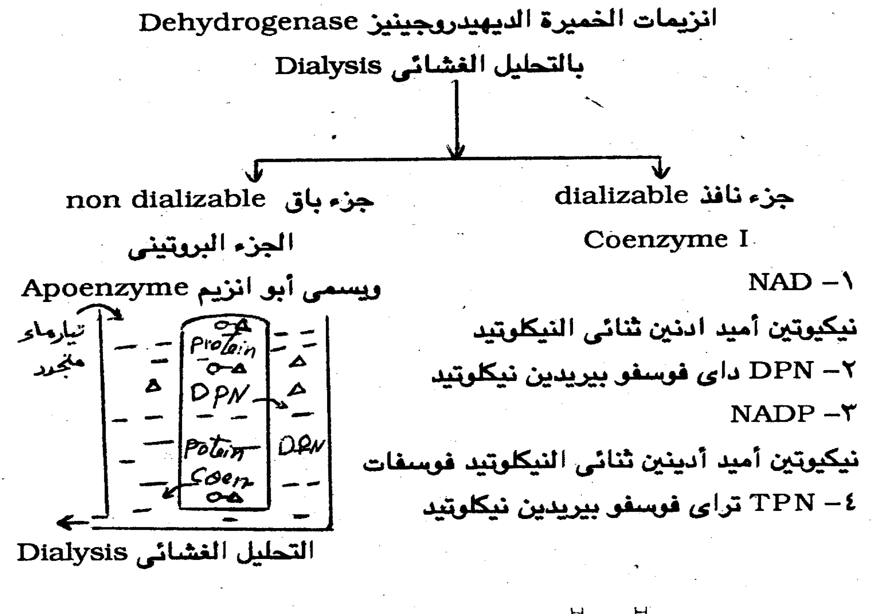
٥- إنزيمات الايزوميريز التشابه Isomerases وتشمل Racemases, epimerases .

٦- الانزيمات الرابطة ligases وتشمل الانزيمات التى تحفز ربط جزئيين معا مع انطلاق روابط غنية بالطاقة وتسمى انزيمات التخليق.

موافقات الانزيم Cofactors

تتكون الانزيمات عموماً من شق بروتينى هو الابوانزيم Apoenzyme وشق غير بروتينيهو مرافق الانزيم واذا كان الارتباط بين الابوانزيم والشق غير البروتينى ضعيف سمت المجموعة بمعاون الانزيم conenzyme ومثال ذلك مركبات معاون إنزيم NADP, NAD وتعرف بمعاون إنزيم II,I على التوالى وهى معاونات جلوكوز ٦ فوسفات ديهيدرجينيز.

أمــا اذا كــان ارتبــاط الشـق Glucose-6-phopate dehydrogenase الغـير بروتيني ارتبـاط شـديد مـع الشق البـروتيني Apo-enzyme ســـمت المجموعة بالمجموعـة المرتبطة prosthetic group مــثل FMN ، FAD فلافين ثنائى النيكلوتيد واسـتطاع هاردن ويونج Harden & young تفـريد إنزيماتالأكسدة والاختزال فى الخميرة إلى :



$$\text{NAD}^+ \text{ (oxidized)} + 2H \rightleftharpoons \text{NADH (reduced)} + H^+$$

(HC–C(H)=C–CO·NH$_2$ ring with $\overset{+}{N}$–R) + 2 H ⇌ (HC–CH$_2$–C–CO·NH$_2$ ring with N–R) + H^+

NAD$^+$ (oxidized) NADH (reduced)

adenine moiety

riboflavin moiety formula of flavin-adenine dinucleotide (FAD)

و FMN والفلافين أحادى البنيكلويد ، FAD هو الفلافين أدينين ثنائى النيكلوتيد وهو معادن إنزيم الديهيدروجينيز Co-enzyme ونــــواة الايزوالكسوزين هى المسئولة عن عمليات فصل الهيدروجين .

NH_2–(reduced enzyme) $\underset{+H_2}{\overset{-H_2}{\rightleftharpoons}}$ FMN–(oxidized enzyme)

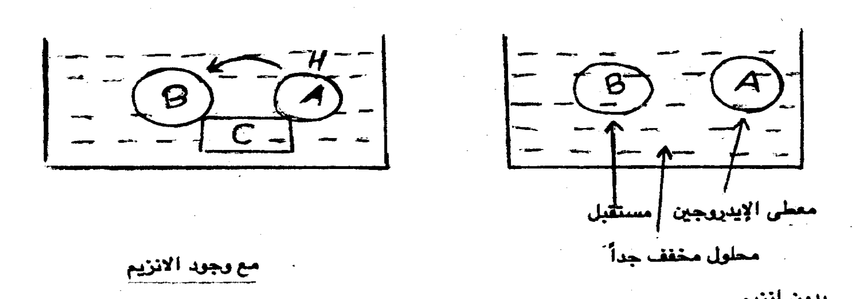
ميكانيكية عمل الانزيم Mechanism of enzyme action

تتم عملية التفاعل بإتحاد مادة التفاعل S مع الانزيم E لتكوين مركب وسطى (ES) وهو مركب غير ثابت تحت ظروف التفاعل وتتحلل بسرعة فائقة إلى المركبات C, B .

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + B + C$$

الانزيم   مادة التفاعل   مركب وسطى   الانزيم   نواتج

وشرح النظريات المختلفة لميكانيكية عمل نشاط الانزيم كثيرة نكتفى منها بالتفسير الآتى . فقد وجد أن معظم التفاعلات الانزيمية تتم فى محاليل مائية مخففة ونفرض أن A هو معطى الهيدروجين و B هو مستقبل الهيدروجين ومعدل انتقال الهيدروجين من A إلى B يعتمد على تصادم او تلاقى callision فيكون فعل العامل المساعد أو الانزيم كعامل جذب وعامل توجيه . وعملية التلاقى تكون نادرة فى المحاليل المخففة. والأن نفترض وجود (C) وهوالعامل المساعد الذي يعمل تلاقى بين B,A ولزيادة فرصة التلاقى لابد من عمل جذب B,A على سطح الانزيم فتزيد سرعة التفاعل عن التفاعل العادى بمعدلات من 10^{6} إلى 10^{12} مرة. بجانب القدرة على توجيه B,A إلى السطح . ووجود مركب وسطى غير ثابت عالى النشاط ES من الانزيم ومادة التفاعل ولكن طبيعة الرابطة بينهما غير معروفة تماماً ولقد فرض أنها رابطة تعاونية فى كثير من المركبات الوسطية بدون انزيم، ويحلل المركب ES لبعض نواتج التفاعل أو يعطى مركبات نشطة تتفاعل بعد ذلك.



تخصص الانزيم : Enzyme specificity

يوجد من التخصص فى الانزيمات نادراً ماتوجد فى العوامل المساعدة غير الحيوية non Biological catalysis وهناك إنزيمات اكثر تخصصاً وأخرى أقل تخصصاً ولقد ثبت بعد تقدم طرق فصل وتنقية الانزيمات أن الانزيمات الاقل تخصصاً هى فى الحقيقة مخلوط من العديد من الانزيمات المتخصصة ويتنوع التخصص فى الانزيمات إلى :

(١) الانزيمات المتخصصة على التفاعل : Reaction specifieity

يعتبر التحليل المائى بالانزيمات من أفضل الامثلة للتخصص على نوع التفاعل حيث تعتبر انزيمات متخصصة بالتحليل بإضافة جزئ الماء مثال ذلك :

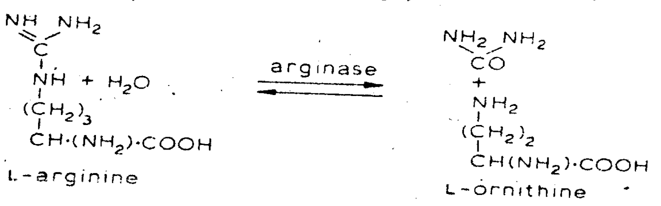
١- محللات الدهون lipeases ومحللات البروتين proteineases.

٢- إنزيمات الاكسدة والاختزال Dehydrogenases وكلهـا يكون مطلوب لها معاون إنزيم NAD Co-enzyme I وعلى ذلك فإن تخصصها للتفاعل يبقى فى جزء معاون الانزيم I أو NAD .

(٢) الانزيمات المتخصصة على مادة التفاعل substrate specificity

ويعنى أن الانزيم متخصص على مادة تفاعل معينة وتقسم إلى عدة أنواع من التخصص داخل مواد التفاعل .

١- التخصص على المشابهات الضوئية للمركب steric specificity حيث يعمل إنزيم الارجينيز على ل-أرجنين L-Arginine ولايعمل على الـ D-Ariginine ويحول ل-أرجنين إلى يوريا وأورانثين.



٢- مثال أخر لهذا النوع من التشابه هو إنزيم lactic acid dehydrogenase النازع للهيدروجين من ل-حامض اللاكتيك L-lactic acid ولايعمل على D-lacticacid .

$$\underset{\text{L(+) latic acid}}{\begin{matrix} CH_2 \\ | \\ HOCH \\ | \\ COOH \end{matrix}} \underset{NAD}{\overset{-2H}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{pyruvic acid}}{\begin{matrix} CH_3 \\ | \\ C=O \\ | \\ COOH \end{matrix}}$$

٣- انزيمات تعمل على التشابة الفراغى مشابة Cis ولاتعمل على الصورة المخالفة Trans ومثال لها إنزيم نازع الهيدروجين من حامض السكنيك succinic acid dehydrogenase .

(٣) التخصص البسيط low specificity

$$AOH + BH \underset{}{\overset{\text{تحليل مائى}}{\rightleftharpoons}} A + B + HoH$$

ويكون المطلوب الرابطة فقط ومثال ذلك انزيم الليبيز وهو متخصص على تحليل الروابط بين الاحماض الدهنية والجلسرين كما يمكنها تحليل الاسترات لكحول الايثايل مثل إستر ايثايل بيوترات.

(٤) تخصص المجموعة Group spicifiecity

الانزيمات المتخصصة على مجموعة معينة حيث يتم التخصص على الرابطة ويلزم وجود أحد المجاميع المعينة على أحد جانبى الرابطة ومثال لذلك إنزيم الكربوكس بتيديز الذى يعمل على الرابطة البيتيدية ولكن يلزمه وجود مجموعة كربوكسيل طرفية حرة فى الوضع الفا مجاورة للرابطة البتيدية كما فى الشكل

$$-\overset{R}{\underset{H}{C}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\overset{H}{\underset{H}{N}}-\overset{H}{\underset{R}{C}}-COOH \qquad -\overset{R}{\underset{H}{C}}-\overset{H}{C}-\underset{O}{\underset{\|}{N}}-\overset{H}{\underset{R}{C}}-NH_2$$

يحلل هنا ↑ (بين C و N في الصيغة الأولى) — لايحلل هنا ↑ (بين C و N في الصيغة الثانية)

(٥) التخصص المطلق Absolute specificity

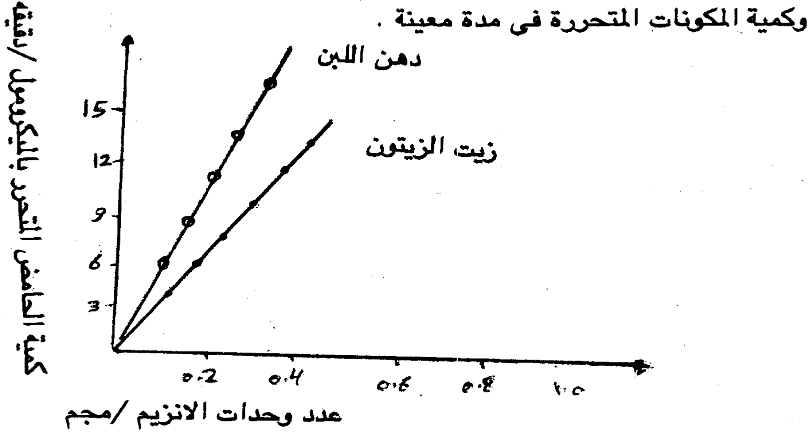
حيث يكون هناك ثلاث متطلبات الرابطة وكلا المجموعتين الفعاليتين على جانبي الرابطة ومثال لذلك إنزيم المالتيز Maltase الشعير الذى يعمل على الرابطة الجليوكوسيدية بين سكرين الجلوكوز من نوع الفا (١-٤) (جلوكو بيرانوسيد) ولا يعمل على أى رابطة جليوكوسيدية أخرى وكذلك الانزيم البيتاجلاكتوسيديز الذى يعمل على الرابطة الجليكوسيدية بيتا (١-٤) بين سكرى الجلوكوز والجلاكتوز (جلاكتوبيرانوسيد) ويشترط وجود الجلوكوز والجلاكتوز على جانبى الرابطة.

ومن أمثلة التخصص المطلق والتى سبق ذكرها إنزيم الارجينيز الذى يعمل على ل-أرجنين ولايعمل على د-أرحنين أو أى مشتقات أخرى للارجنين.

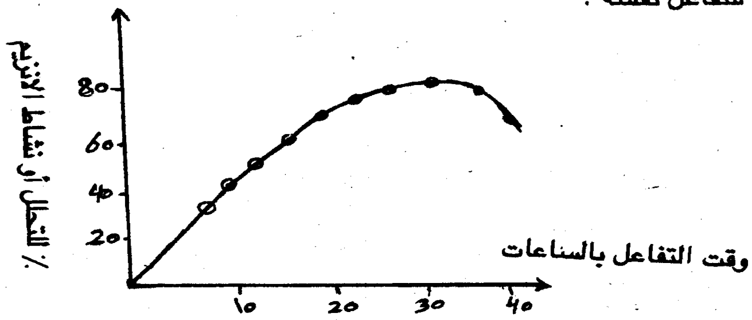
حركيات الإنزيمات Kinetics of enzymes

(١) نشاط الانزيم Enzyme activity

هناك علاقة طردية بين سرعة التفاعلات الانزيمية ونشاط الانزيم وخاصة فى المراحل الأولى للتفاعل ويستفاد من ذلك فى معرفة نشاط الانزيم المجهول فى مادة ما كما يظهر من العلاقة بين نشاط الانزيم Enzyme activation وكمية المكونات المتحررة فى مدة معينة .



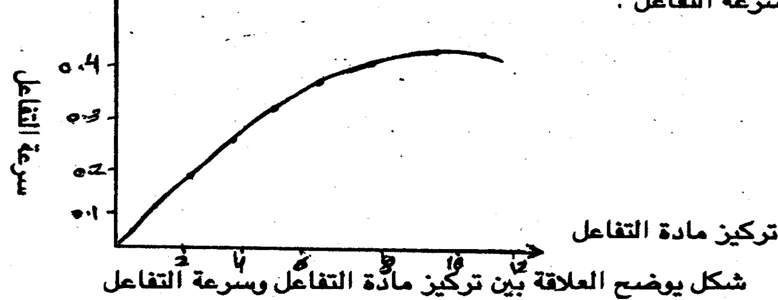
وهذه العلاقة الطردية تنخفض بإنخفاض سرعة التفاعل الانزيمى لإنخفاض نشاط الانزيم وحدوث تثبيط للتفاعل بسبب تراكم النواتج النهائية للتفاعل نفسه .



شكل يوضح تحلل زيت الزيتون بواسطة إنزيم الليبيز خلال ٤٠ ساعه

(٢) تركيز مادة التفاعل substrate concentration

لمادة التفاعل أهمية كبيرة فى سرعة التفاعلات الأولية للانزيمات وينطبق ذلك على مجال الصناعات الغذائية . وتتناسب سرعة التفاعل طردياً مع تركيز مادة التفاعل أو المادة التى يؤثر عليها الانزيم . فعند زيادة تركيز المادة الخاضعة (مادة التفاعل) فتحتاج لعدد وحدات إنزيم أكثر لسير التفاعل بنفس التناسب وعلى العكس عند قلة تركيز مادة التفاعل وزيادة عدد وحدات الانزيم تزداد سرعة التفاعل .



شكل يوضح العلاقة بين تركيز مادة التفاعل وسرعة التفاعل

(٣) تأثير درجة الحرارة Effect of temperature

هناك علاقة بين سرعة التفاعل الكيماوى ودرجة الحرارة المطلقة وتوضح هذه العلاقة فى معادلة أرهنييس Arrhensium

حيث K = ثابت سرعة التفاعل .

$$2.3 \log K = B - \frac{Ea}{RT}$$

R = ثابت الغاز ويساوى ١,٩٨ (سعر/ مول/درجة)

E = طاقة التنشيط وهى الطاقة اللازمة (تنشيط) المواد الداخلة فى التفاعل anergy of activation

B = ثابت يعبر كيفياً عن درجة تردد التصادمات للجزئيات المتصادمة ومن هذه العلاقة نجد أن سرعة التفاعل تزيد بزيادة درجة الحرارة إلى درجة قصوى وبعدها تنخفض سرعة التفاعل ويرجع ذلك إلى حدوث درجة الحرارة إلى درجة قصوى وبعدها تنخفض سرعة التفاعل ويرجع ذلك إلى حدوث تغيرات فى طبيعة الانزيم (تغير فى الشكل البنائى للانزيم) Denaturation بسبب ارتفاع درجة الحرارة .

(٤) تأثير الأس الايدروجينى effect of pH

تؤثر ال pH تأثيراً واضحاً على سرعة التفاعل الانزيمى حيث وجد أن لكل إنزيم درجة pH مثلى تسمى درجة الـpH المثلى optimum pH التى يكون عندها سرعة التفاعل الانزيمى ويرجع ذلك إلى حدوث تغير فى طبيعة الانزيم أو إنفصال عامل ضرورى للتفاعل عند أعلى حد لها، وفى الحدودالأعلى أو الأقل ويرجع ذلك إلى حدوث تغير فى طبيعة الانزيم أو إنفصال عامل مساعد ضرورى للتفاعل من درجة الـpH تقل سرعة التفاعل الانزيمى ويتأثر الـpH الامثل ١- بوجود المجاميع الحامضية فى المركز الفعال للانزيم

٢- أن تكون مادة التفاعل متأينة أو غير متأينة.

مراكز النشاط الفعال للانزيم Site of enzyme activity

. فعندما يتفاعل انزيم (E) مع مادة تفاعل (S) فإنه يتم فى مناطق محدده على جزئ البروتين بين مادة التفاعل والانزيم وهذه المناطق يطلق عليها مراكز النشاط الفعال Active site of ensyme.

وتتكون مراكز النشاط الفعال للانزيم من مجاميع فعاله Active groups من بعض الاحماض الامينية توضع مع بعضها سوياً جنباً إلى جنب وبترتيب معين بواسطة الالتفافات coils الحادثة لجزئ الإنزيم، ويمكن أن نتوقع مجموعة فعاله واحده أو اكثر من المجاميع الجانبيه للاحماض الامينية مثل (مجاميع SH، OH - NH2 ، CooH -، معدن معين وخلافه) ولقد عرف العديد من مراكز النشاط الفعال للعديد من الانزيمات ، بطرق التعليم المختلفة lableling techniques أمكن معرفة الخريطة الببتيدية اللازمة لفعل كل انزيم من الانزيمات على جانبى الجزئ والتى تستخدم كمركز نشاط فعال للانزيم، الجزء الببتيدى خارج مركز النشاط الفعال لايساهم مباشرة فى ربط مادة التفاعل ولكنه هام لإمداد الانزيم بالعمود الفقرى الاساسى ويدعم مراكز النشاط الفعال للإنزيم ويحدد الاتجاهات والاوضاع فى الفراغ لمراكز النشاط الفعال ويؤثر بطريقه غير مباشره فى نشاط وتخصص الانزيم، وبالمثل الترتيب الفضائى spatial arrangement لجزئ البروتين يقرر اتجاه مراكز النشاط الفعال ويخلق اوضاع مكانيه stric conclions والتى تساعد فى تكييف عدد من مواد التفاعل وترفض التفاعل مع مواد أخرى .

ويعتبر إنزيم التريبسين مثال لانزيم مركز نشاط الفعال الاساس به مجموعه Sh-

تثبيط الانزيمات Enzyme inhibition

تعمل المنشطات activators على زيادة سرعة التفاعلات الكيماوية

الحيوية ويمكن أن نبطئ سرعة هذه التفاعلات عند وجود المثبطات Inhibitors ومن الميكانيكات المعروفة للتثبيط :-

١- التثبيط بالمنافسة Competitive inhibition :

يحدث هذا النوع من التثبيط نتيجة تنافس المادة الخاضعة (S) والمادة المثبطه (I) على موضع الربط للانزيم Actives siet of enzyme

هذا ويتم التثبيط فى هذا النوع عن طريق اتحاد الانزيم (E) مع مادة التفاعل الشبيهه (I) بمادة التفاعل الاصلية (S) لتعطى المركب complex EI وهو مركب ثابت لايتم إنقسامه وتتشابه المادة الخاضعة (S) فى الاتحاد بالانزيم فيما يكون المركب الوسطى الأصلى للتفاعل (ES) مركب سريع الانقسام إلى (C,B) وهى نواتج التفاعل

$$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow C + B + E$$

وفرصة المادة الخاضعة للارتباط بالانزيم تكون فى الاحوال العادية كبيرة فتربط بمراكز النشاط الفعال للإنزيم، ويقل المركب EI complex وهو مركب ثابت لايتعلل ولايتحرر الانزيم منه وتقل فرص مراكز النشاط الفعال للانزيم للارتباط بمادة التفاعل (S) وهذا يسبب نقص سرعة التفاعل الكيماوى الحيوى، هذا وكلما زاد ثبات المركب (EI) كلما كان المثبط أقوى تأثير more efective، وإذا كان (EI) ثابت تماماً فإن الانزيم يتوقف تماماً عن أداء دوره الحيوى أو وظيفته ويقال أن الانزيم تسمم Enzyme poisone وميكانيكية عمل المثبط بالمنافسة تشبه نظرية القفل والمفتاح ويمثل الانزيم بالقفل، والمادة الخاضعة بالمفتاح، والمادة المنافسة بالمفتاح الشبيه. ولفتح القفل (الانزيمE)لان أن يناسبه المفتاح الاصلى (S) والمفتاح الخاطئ (المثبط I) لايمكن أن يفتح القفل ولكن يمكن أن يدخل فى فتحه قفل الباب وعند دفعه فى قفل الباب قد يناسبه أثناء الدخول وقد لايخرج منه ويلتصق به ولايمكن بعد ذلك إدخال المفتاح الاصلى .

CH2- COOH　　S.A Dehydrogenase　　CH- COOH
|　　——————————→　　‖
CH2- COOH　　　　　　　　　　　　CH- COOH

succinic asid　　　　　　　　　　formic acid

ومثال لهذا النوع من التثبيط . تفاعل انزيم نازع الايدروجين من حمض السكسنيك succinic acid dehydrogenase

التثبيط بالمنافسة Competetive inhinbitior

عند إضافة حامض المالونيك الى حامض السكسنيك فإن الانزيم (E) سوف يتحد مع حامض المالونيك (المادة المثبطه I) ويتكون مركب ثابت (EI) مما يسبب تثبيط التفاعل الاصلى بين حامض السكسينك ، ونازع أيدروجين حامض السكسينك وذلك راجع إلى التشابه الكبير بينهم فى التركيب structure وحامض المالونيك هنا يماثل المفتاح الخطأ للقفل .S.A dehydrogenase (الانزيم) ويمثل هنا القفل ويتداخل مع عملية فتح الباب التفاعل الكيماوى.

والمثبطات بالمنافسة يمكن أن تقوم بسد Blocking المسار لبعض المتحولات metabolites وتسمى فى هذه الحالة antimetabolites (مضادات المواد المتحوله)، ومن المعروف أن الميكروبات المرضيه تحتاج مركب para amino benoic acid (PABA) لنموه وتكاثرها وعند وضع مركب P-amin asulphoamide (PASA) وهو مثبط بالمنافسة .



P. Amino benioc Acide　　　　P. A phenyl Sulphon amide

بارا أمينو حامض البنزويك　　　　التثبيط بالمنافسة

مادة التفاعل

- والعديد من المضادات الحيويه والمواد الحافظة للاغذية Antibiotics تلعب دور مثبط بالمنافسة للمرض أو ميكروب الفساد فتوقف نموه وتكاثره.

مثبط التربسين Trypsin inhibitor

بعض المواد فى بذور فول الصويا أو الفول عموماً تعمل كمثبط بالمنافسة

E + S ⟵ competetive inhibitor ⟶ ES peptides

مادة التفاعل + الأنزيم مركب وسطى

Try + Protein ⇌ Protein- Trypsin ⇌ peptides

فى الحالات العادية يتم الاتحاد بين الانزيم والبروتين وتيكون مركب سريع التحلل ويتحرر الانزيم

E + I ⟶ Protein inhibitor

مثبط + الانزيم بروتين مثبط (مركب ثابت)

فى حاله وجود المثبط يتكون مركب وسطى (مركب ثابت) ولايتحرر الانزيم ولايتواجد للتفاعل مع البروتين .

يرجع الفعل التثبيطى إلى عدة مركبات بروتينية ذات وزن جزيئى صغير تعرف باسم مثبطات فول الصويا للتربسين soybean trypsin inhbtior وتوجد هذه المثبطات فى البقوليات وفى بياض البيض بنسبة صغيره وتكسر هذه المثبطات بالغليان والحرارة تحت ضغط ويطلق على هذه البروتينات (SBT_1A_2, SBT_1A_1) ذات وزن جزئى MW (١٤,٣٠٠ - ٣١,٦٠٠) على التوالى هذه وتتحد هذه المثبطات تماماً وإلغاء تاثيرها بالتسخين على حرارة عالية تحت ضغط A ، ويمكن التفريق بين التثبيط التنافسى واللاتنافسى بأن الاول يعتمد على تركيز المادة الخاضعة (S) وتركيز المادة المثبطة (I) وكذلك قيمة مع المادة المثبطه بالنسبة (EI) ويمكن التغلب على هذا النوع من التثبيط

بزيادة تركيز (S) المادة الخاضعة.

التثبيط اللاتنافسى Non competitive inhibition

يحدث هذا النوع كنتيجة لعمليات الدنتره denaturation بواسطة الحرارة (تسخين أعلى من ٦٠م أو اضافة الاحماض والقلويات القوية- المواد الكيماوية الاخرى) كذلك بعض مركبات الفوسفور العضويه التى تعمل على تحليل الروابط الاستريه والببتيديه وتعرف مجموعة المركبات الفوسفورية (بالغازات المسممة للأعصاب) وذلك لتاثيرها السمى للانزيمات الموجودة فى الجهاز العصبى.

المنشطات Activators :

تحتاج أغلب الانزيمات لتفاعلها لتواجد العناصر المعدنية على صورة أيونات لفعاليتها مثال ذلك أنزيمات :

١- البكتين ميثيل استريز pectin methyl estrase

يلزم له بعض الايونات الاحادية والثنائية مثل البوتاسيوم والكالسيوم لتنشيطه ويراعى استخدام الكالسيوم بنسبة منخفضة أى يراعى استخدام التاثير المنشط بالنسبة المثلى لتركيزه الأفضل optimum concentration

٢- يلزم إضافة مركب He المحتوى على Fe^{++} لتنشيط الجزء البروتينى من البيروكسيديز peroxidae Apoenzymes .

٣- العوامل المختزلة كمنشطات Reducing agents as activators

تنشط المواد المختزلة مثل الجلوتاثيون والسستين بعض الانزيمات مثل إنزيمات البابيين والنيسين والبروملين وهذا التنشيط يكون عن طريق فك مجمعات السلاسل الببتيدية المرتبطة بروابط S-S حيث تتحول الى SH .

-S-S- -S-S- -S-S- -S-S- ⟶ SH SH SH SH

polymers المجمعات ⟶ monomers أحاديات

تأثير الحرارة على إيقاف نشاط الانزيمات

Inactivation of enzymes by heat

يتم دنتره الانزيمات بالحرارة كما تدنتر البروتينات بها، وكما ذكر سابقاً فالانزيمات هي عموماً حساسة للحرارة thermolabile ويكفى لاستعمال حرارة من ٧٠م – ٨٠م/٥ق لتحطيم نشاط الانزيمات .

يستعمل ايقاف نشاط الانزيمات بالحرارة على نطاق واسع فى الصناعات الغذائية بالحرارة إذا أريد حفظه من عمل الانزيمات واستمرار الانزيمات نشطه يمكن أن يؤثر فى لون الكوروفيل والكاروتين ويمكن أن يسبب ظاهره اللون البنى Broning ويمكن أن يغير الكربوهيدرات إلى مركبات حامضيه أو يسببب تزنخ الدهون أو يقلل من القيمة الغذاية للفيتامينات أو تحلل البروتينات.

واستعمال الحرارة يكون من خلال عمليات التعقيم أو البسترة ويمكن أ ن يستعمل اختبارات معينه للاستدلال على المعاملات الحرارية فمثلا إبادة الانزيمات الفوسفاتيز القلوى Alkaline phospatase تدل على كفاءة عملية البستره بينما عدم وجود إنزيم البيروكسيديز فى اللبن يدل على أن هذا اللبن سبق غليه.

– مقاومة الانزيمات للحرارة :

تختلف مقاومة الانزيمات للحرارة اختلافاً بيناً فمثلاً البيروكسيديز من مصدر نباتى يتحلل عند درجة حرارة ١٢٠م/لمدة دقائق ، ويعتمد تحطم الانزيم على عوامل أخرى عديدة منها الـ pH، الاملاح وقوتها الايونيه والحالة الطبيعية للانزيم.

إعادة النشاط لبعض الانزيمات فى صناعة الغذاء
Reactivation of enzymes :-

إن إعادة نشاط بعض الانزيمات عرفت فى صناعات غذائية عديدة وسبب هذه الظاهرة هى عدم كفاية المعاملة الحرارية للغذاء على ترتيب مراكز النشاط الفعاله للانزيمات قضاء غير عكسى إذ بعد التخزين فى ظروف ملائمة يعود النشاط مره أخرى ومثال على ذلك الليبيز فى اللبن مسبباً حدوث التزنخ أو إعادة نشاط إنزيم البروتييز فى اللبن الـ UHT حدوث ظاهرة التجبن الحلو sweet gelation وإعادة نشاط البيروكسيديز فى الخضر ، عموماً فإذا ثبات الاغذية ضد الفساد يدل على كفاءة وعمق المعاملة الحرارية .

الانزيمات المرتبطة على عمود Immobilized enzymes

لما كانت الانزيمات مرتفعة الثمن فإن ذلك حد من استعمالها فى صناعة الغذاء كذلك أمكن ربط الانزيمات حامل غير ذائب ويمكن فصله بسهولة بعد أداءعمله من مخلوط التفاعل واستعماله مرات ومرات وتم تطبيق الفكرة على نطاق صناعى فى الولايات المتحدة والدول الغربية :

Referaneces

Bailey , J.L , Techniques of Protein Chemistry , 2 nd edn ., Elsevier , Amsterdam , 1967.

Dickerson , R . E . and Geis .I ., The Structure and Action of proteins , Harper and Row Publishers , New York , 1969

Elmore , D,T ., peptides and proteins ,University Press Cambridge . 1968.

Neurath , H ., The Protiens , 3 rd edn ., Vols , I,IV , Academic Press Inc ., New York ,1963 ,1966

Sanger , F, and , Tuppy , H , The Amino Acid Sequence in the phenylalanyl Chain of Insulin , Biochem , J, 49, 463 ,490 (1951) .

Shultz , H.W and Anglemier ,A.F .(Eds) , Proteins and their Reactions , The Avi Publishing Co ., Wesport , Conn ., 1964.

Tanford , C., Protein Denaturation , in Advances in protein Chemistry , Vols . 23 and 24 , Academic Press New York , 1968 and 1970 .

BRAVER MAN'S Introduction the Biochmistry of Foods By 2. Beek D . of F.E atech .
Fechrion istiute of technology Ha Fa (ciccupioid plastion)
Elcevier Scintific Company Amestrdam oxford N.Y (1976)

ايزيس على زرنوار (١٩٨٦) الغذاء والتغذية
دار المطبوعات العربية - الاسكندرية

سعد شهاب ترجمة أسس الكيمياء الحيوية (١٩٨٠)
دار ماكجر وهيل للنشر